

THE LIBRARY OF THE  
MAY 1 1930  
UNIVERSITY OF ILLINOIS

# **COLLECTED REPRINTS**

**FROM THE**

**GEORGE WILLIAMS HOOPER FOUNDATION  
FOR MEDICAL RESEARCH**

**VOLUME XII**

**1928-1929**

*(Issued Spring 1930)*















610  
C 12/C  
v. 12

DECLARATION OF TRUST  
OF  
THE GEORGE WILLIAMS HOOPER FOUNDATION  
FOR MEDICAL RESEARCH

---

*(Quotation outlining the purposes of the Foundation)*

“The net income of the endowment fund shall be expended in the maintenance and conduct of said School of Medical Research, which shall conduct and carry on investigations in the sciences and arts of hygiene, medicine and surgery; also in the nature and causes of disease and in the methods of its prevention and treatment, and shall disseminate gratuitously all knowledge so acquired.”







THE GEORGE WILLIAMS HOOPER FOUNDATION  
FOR MEDICAL RESEARCH

---

THE BOARD OF TRUSTEES

President W. W. CAMPBELL  
President of the University of California

Mr. ARTHUR H. FOSTER  
Regent of the University of California

Dr. DAVID L. EDSALL  
Dean of the Harvard Medical School, Boston, Massachusetts

Dr. HERBERT C. MOFFITT  
Professor of Medicine, University of California Medical School

Mr. R. I. BENTLEY  
President California Packing Corporation

Mrs. WIGGINTON E. CREED

Mr. EDWARD D. CONOLLEY  
Representative of the Hooper Estate

Dr. KARL F. MEYER  
Director of the Laboratories





#### MEMBERS OF THE LABORATORY STAFF

- KARL F. MEYER, A.B., Ph.D., Associate Professor of Tropical Medicine, 1915-21; Professor of Research Medicine, 1921-23; Professor of Bacteriology, 1923-30; also Director of Research, National Canners Association Laboratory.
- ERNEST L. WALKER, B.S.A., S.D., Associate Professor of Tropical Medicine, 1914-21; Professor of Tropical Medicine, 1921-30.
- JACOB C. GEIGER, M.A., M.D., Dr.P.H., Associate Professor of Epidemiology, 1928-29; Professor of Epidemiology, 1929-30.
- HERMANN SOMMER, Ph.D., Ferdinand Stabel Research Associate, 1924-26; Research Associate in Bacteriology, 1926-28; Assistant Professor of Research Medicine, 1928-30.
- PAULA SCHOENHOLZ, A.B., M.A., Assistant in Research Medicine, 1921-25; Associate in Research Medicine, 1925-28.
- JANET B. GUNNISON, A.B., M.A., Edith Claypole Fellow, 1925-26; Research Assistant in Department of Bacteriology, 1926-28; Associate in Research Medicine, 1928-30.
- GEORGE E. COLEMAN, A.B., Volunteer Collaborator, 1921-22; Research Associate in Medicine, 1926-30.
- HENRY H. DARLING, M.D., Research Associate in Medicine, 1927-30.
- EDWARD MATTZGER, M.D., Research Associate in Medicine, 1928-30.
- BERNICE U. EDDIE, A.B., M.A., Teaching Fellow Hooper Foundation, 1925-26; Assistant in Department of Bacteriology, 1926-28; Associate in Bacteriology, 1928-30.
- BEATRICE F. HOWITT, A.B., M.A., Research Associate in Medicine, Infantile Paralysis Investigations, 1927-30.
- MARION SWEENEY, Assistant in Research Medicine, 1921-30.
- HAROLD L. AVERILL, M.A., M.D., Research Assistant, 1926-27.
- LUCIEN D. HERTERT, A.B., M.A., Teaching Fellow, 1927-28; Research Assistant, 1929-30.
- RUDOLPH STOHLER, Ph.D., Research Assistant, 1928-30.
- A. BATCHELDER, Research Technician, 1925-27.
- ALFRED JORDI, M.D., Edith Claypole Fellowship, 1928-30.
- ELEANOR RANKIN, Assistant to the Director, 1928-30.
- JEANNE LOMMEL, M.D., Belgian Exchange Fellow, C.R.B. Foundation, 1927-28.





#### COLEMAN FUND

K. SCOTT BISHOP, A.B., M.D., Associate in Anatomy, 1920-24; Histopathologist, 1924-28; Research Associate, 1928-29.  
MORITZ WEBER, M.D., Associate in Research Medicine, 1927-30.

#### DENTAL RESEARCH GROUP

HERMANN BECKS, M.D., D.D.S., Associate in Research Medicine, 1928-30.  
W. C. FLEMING, D.D.S., College of Dentistry.

#### LABORATORY FOR THE STUDY OF BOTULISM IN FISH PRODUCTS AT SAN FRANCISCO AND WILMINGTON

(Supported by grants from the California State Fish and Game Commission.)

O. W. LANG, A.B., M.S., Research Assistant, 1924-26; Research Associate, 1926-30.  
ELIZABETH WAGNER-SOMMER, A.B., Assistant in Research Medicine, 1921-25; Associate in Research Medicine, 1925-26; Research Associate, 1926-30.  
S. J. DEAN, Ph.C., Research Assistant, 1927-29.  
R. S. FELLERS, A.B., Research Assistant, 1926-29.  
H. P. STEVENS, Research Assistant, 1928-30.

#### LABORATORY FOR RESEARCH IN THE CANNING INDUSTRIES 322 Battery Street, San Francisco

(Supported by grants from the National Cannery Association, The American Can Company, and the California State Fish and Game Commission.)

J. RUSSELL ESTY, M.S., Ph.D., Research Assistant, 1921-22; Research Associate, 1926-29; Assistant Professor of Bacteriology, 1929-30.  
C. T. TOWNSEND, A.B., M.A., Research Assistant, 1926-30.  
H. EHRENBERG, D.T.Sc., Research Assistant, 1926-30.  
F. S. PAINE, A.B., M.S., Research Assistant, 1927-30.  
C. O. BALL, Ph.D., Research Staff, American Can Company.

#### LABORATORY FOR THE STUDY OF DISEASES OF FISH AND GAME

(Supported by the California State Fish and Game Commission)

P. A. SHAW, B.S., M.A., Toxicologist, 1928-30.  
H. VAN ROEKEL, A.B., D.V.M., Pathologist, 1928-29.

#### PACIFIC INSTITUTE OF TROPICAL MEDICINE

ALFRED C. REED, A.B., M.D., Professor of Tropical Medicine, 1928-30.  
PAUL G. CAPPS, M.D., Research Associate, 1929-30.  
DOROTHY KOCH, A.B., M.A., Research Associate, 1929-30.



#### VOLUNTEER AND SPECIAL WORKERS

M. S. MARSHALL, Ph.D., Department of Bacteriology.

FREDERICK EBERSON, M.S., Ph.D., M.D., Department of Medicine.

FRANK HINMAN, A.B., M.D., F.A.C.S., Department of Urology.

JOHN A. MARSHALL, Ph.D., D.D.S., College of Dentistry.

ERNST WOLFF, M.D., Department of Pediatrics.

O. B. WILLIAMS, A.B., M.A., Ph.D., Department of Bacteriology, 1925-27; now  
University of Texas.

N. M. PHATEK, B.S., Department of Pediatrics.

F. RENE VAN DE CARR, A.B., Graduate Student.

KATHLEEN KILGARIFF, A.B., Graduate Student.

RICHARD D. FRIEDLANDER, A.B., Graduate Student, Research Assistant, 1927-28.

G. CARONIA, M.D., Gianinni Professor of Research Medicine.

## CONTENTS

---

345. Tropical Medicine (The Scientific Monthly, Nov. 1929, Vol. XXIX, pp. 458-464), by Alfred C. Reed.
346. Some New Aspects of the Etiology and Endemiology of Leprosy (The Journal of Preventive Medicine, Vol. 3, No. 3, May, 1929, pp. 167-195), by Ernest Linwood Walker.
347. The Identity of Human Leprosy and Rat Leprosy (The Journal of Preventive Medicine, Vol. 3, No. 4, July, 1929, pp. 325-333), by Ernest Linwood Walker and Marion A. Sweeney.
348. Malaria—A Practical Review (California and Western Medicine, April, 1929, Vol. XXX, No. 4, 15 pp.), by Alfred C. Reed.
349. Bone Pathology and its Relations to the Problem of Otosclerosis (Annals of Otology, Rhinology and Laryngology, Dec. 1928, Vol. XXXVII, No. 4, pp. 1232-1256), by Moritz Weber.
350. Osteodystrophia fibrosa, ihre psdutotumor-und cystenbildende, juvenile, hyperostotisch-porotische Form beim Hund, zugleich ein Beitrag zur Frage ihrer Pathogenese und Ätiologie (Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur allgemeinen Pathologie, Bd. 82, 1929, 81 pp.), by Moritz Weber.
351. A Clinical Study of Tuberculin Fractions Prepared from Nonprotein Culture Media (The American Review of Tuberculosis, Vol. XIX, No. 3, March, 1929, pp. 327-349), by Frederick Eberson and Ernst Wolff.
352. A Clinical Study of Tuberculin Fractions Prepared from Nonprotein Culture Media (California and Western Medicine, Oct. 1928, Vol. XXIX, No. 4, 5 pp.), by Frederick Eberson and Ernst Wolff.
353. The Surgical Treatment of Lower Tract Tuberculosis, Genital and Vesical (Journal of Urology, Vol. XX, No. 5, 1928, pp. 521-540), by Frank Hinman.
354. Obstructive Hydro-uterai Angularity with Hydronephrosis in Children. Surgical Treatment (Archives of Surgery, Jan. 1929, Vol. 18, Part I, pp. 21-58), by Frank Hinman.
355. Perineal Prostatectomy (Surgery, Gynecology and Obstetrics, 1929, 14 pp.), by Frank Hinman.
356. General Aspects in Pyorrhea (The Pacific Dental Gazette, May, 1929), by Hermann Becks.
357. Electrolytes of Saliva under Normal and Pathological Conditions (Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. XXVI, 1928, pp. 93-95), by Hermann Becks.
358. Ergebnisse neuerer Speichel-Untersuchungen mit besonderer Berücksichtigung der Gravidität und der Parodontosen (Published by Hermann Meusser, Berlin, 1929, 69 pp.), by Hermann Becks.



359. A Comparison of Resorption of the Roots of Deciduous Teeth with the Absorption of Roots of the Permanent Teeth Occurring as a Result of Infection (The Pacific Dental Gazette, Oct. 1928), by John Albert Marshall.
360. Joint Lesions Produced in Rabbits by the Lactobacillus (The Journal of the American Dental Association, XVI, No. 10, 1929, pp. 1923-1925), by Beatrice F. Howitt.
361. A Comparative Study of the Action of Certain Drugs and Chemicals on Balantidium Coli, Malmsten, in the Guinea Pig (The American Journal of Hygiene, Vol. IX, No. 3, May, 1929, pp. 544-559), by Marion A. Sweeney.
362. Diseases Observed in Game Bird Raising (California Fish and Game, Oct. 1929, Vol. 15, No. 4, pp. 301-308), by H. Van Roekel.
363. Acetic Acid as a Control Agent for Cyclochaete and Gyrodactylus in Hatchery Trout (California Fish and Game, July, 1929, Vol. 15, No. 3, pp. 230-233), by H. Van Roekel.
364. Duck Diseases in Blood Analyses in Diseased Birds (The Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. XXVII, 1929, pp. 6-7), by Paul A. Shaw.
365. Duck Disease Studies: II. Feeding of Single and Mixed Salts (The Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, Vol. XXVII, 1929, pp. 120-122), by Paul A. Shaw.
366. Observations on Snuffles in Rabbits (Journal of Infectious Diseases, Vol. 43, No. 5, Nov. 1928, pp. 442-447), by F. R. Van de Carr and K. J. Kilgariff.
367. Food Poisoning (California and Western Medicine, Nov. 1929, Vol. XXXI, No. 5, 3 pp.), by J. C. Geiger.
368. Experimental Food Poisoning in White Mice with Heat Stable Paratyphoid Poisons (Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1928, Vol. XXVI, pp. 91-93), by J. C. Geiger and K. F. Meyer.
369. A Survey of Amebic Dysentery in Chicago (Journal of the American Medical Association, Feb. 16, 1929, Vol. 92, pp. 528-531), by C. S. Williamson, Bertha Kaplan and J. C. Geiger.
370. Relationship of Atopens (Phleum Pratense) and Australian Rye (Lolium Multiflorum) Grasses as Indicated by Passive Transfer Studies (Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1929, Vol. XXVI, pp. 634-635), by Edward Matzger.
371. Tularemia in Nevada (California and Western Medicine, July, 1929, Vol. XXXI, No. 1, 4 pp.), by J. C. Geiger and K. F. Meyer.
372. Preparation of Specific Serums and Technic of Agglutination Test with Pasteurella Pestis Detoxified with Formaldehyde (Journal of Infectious Diseases, Vol. 44, No. 5, May, 1929, pp. 403-407), by A. Batchelder.
373. Cutaneous Immunization against B. Aertrycke in the Guinea Pig (Journal of Infectious Diseases, Vol. 44, No. 6, June, 1929, pp. 495-502), by Harold L. Averill and K. F. Meyer.

374. Virulence of *B. Paratyphosus* B (Aertrycke) in Guinea Pigs (Journal of Infectious Diseases, Vol. 44, No. 6, June, 1929, pp. 481-488), by R. D. Friedlander and L. D. Hertert.
375. Virulence of *B. Paratyphosus* B (Aertrycke) in White Mice (Journal of Infectious Diseases, Vol. 44, No. 6, June, 1929, pp. 466-480), by R. D. Friedlander and K. F. Meyer.
376. Cutaneous Immunization against the Streptococcus of Guinea Pig Lymphadenitis (Journal of Infectious Diseases, Vol. 44, No. 6, June, 1929, pp. 489-494), by L. D. Hertert and K. F. Meyer.
377. *Bacillus Dysenteriae*—Some Observations on a California Strain (California and Western Medicine, Nov. 1928, Vol. XXIX, No. 5, 1 p.), by Jeanne Lommel.
378. Mussell Poisoning (Journal of Preventive Medicine, Vol. II, No. 5, Sept., 1928, pp. 365-394), by K. F. Meyer and P. Schoenholz.
379. Serologic Types of *Clostridium Tetani* (Journal of Infectious Diseases, Vol. 43, No. 3, pp. 184-188), by George E. Coleman and J. B. Gunnison.
380. Experimental Infection with Spores of *Cl. Tetani*-Tetanus V (American Journal of Hygiene, Vol. IX, No. 1, Jan. 1929, pp. 57-74), by George E. Coleman.
381. *Cl. Botulinum* Type D Sp. N (Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1928, Vol. XXVI, pp. 88-89), by K. F. Meyer and J. B. Gunnison.
382. Susceptibility of *Macacus Rhesus* Monkeys to Botulinum Toxin Type B, C, and D (Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1928, Vol. XXVI, pp. 89-90), by J. B. Gunnison and K. F. Meyer.
383. Intramuscular Infection of Guinea Pigs with Spores of *Cl. Botulinum* (American Journal of Hygiene, Vol. IX, No. 1, Jan. 1929, pp. 47-56), by George E. Coleman.
384. Studies on Botulinus Toxin. 5. Influence of Nitrogenous and Lipoid Compounds on the Potency of Botulinus Toxin (Journal of Infectious Diseases, Vol. 43, No. 6, Dec. 1928, pp. 496-506), by E. Wagner Sommer and H. Sommer.
385. Studies on the Antigenic Substance of *Cl. Botulinum* XXXIII. 1. Complement Fixing Substances in Alcoholic Extracts (Journal of Immunology, Vol. XVI, No. 4, April, 1929, pp. 403-409), by Jeanne Lommel and Janet B. Gunnison.
386. The Occurrence of Nontoxic Strains of *Cl. Parabotulinum* XXXIV (Journal of Infectious Diseases, Vol. 45, No. 2, Aug. 1929, pp. 79-86), by J. B. Gunnison and K. F. Meyer.
387. Comparative Study of Nontoxic and Toxic Strains of *Clostridium Parabotulinum*. XXXV (Journal of Infectious Diseases, Vol. 45, No. 2, Aug. 1929, pp. 87-95), by C. T. Townsend.
388. European Strains of *Cl. Botulinum* XXXVI (Journal of Infectious Diseases, Vol. 45, No. 2, Aug. 1929, pp. 96-105), by K. F. Meyer and J. B. Gunnison.



389. South African Cultures of *Clostridium Botulinum* and *Parabotulinum*. XXXVII. With a Description of *Cl. Botulinum* Type D, N. SP, (*The Journal of Infectious Diseases*, Vol. 45, No. 2, Aug. 1929, pp. 106-118), by K. F. Meyer and J. B. Gunnison.
390. Cultural Study of an International Collection of *Clostridium Botulinum* and *Parabotulinum*. XXXVIII (*Journal of Infectious Diseases*, Vol. 45, No. 2, Aug. 1929, pp. 119-134), by J. B. Gunnison and K. F. Meyer.
391. Botulism due to Home-canned Bartlett Pears, XXXIX (*Journal of Infectious Diseases*, Vol. 45, No. 2, Aug. 1929, pp. 135-147), by K. F. Meyer and J. B. Gunnison.
392. Maximum Oxygen Tolerance of *Cl. Botulinum* A, B, and C of *Cl. Sporogenes* and *Cl. Welchii* (*Journal of Infectious Diseases*, Vol. 44, No. 5, May, 1929, pp. 408-411), by K. F. Meyer.
393. Studi sulla patogenicità degli stipiti di *Brucella abortus* e *Brucella melitensis* sulle scimmie. Per 1 (*Rinascenza Medica Rassegna Quindicinale Di Medicina Biologica*, Anno VI, 1929 [VIII], by K. F. Meyer and B. Eddie.
394. Further Studies on the Pathogenicity of *Br. Abortus* and *Br. Melitensis* for Monkeys (*Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1929, Vol. XXVII, pp. 222-224), by K. F. Meyer and B. Eddie.
395. Certain Acid Tolerant Bacteria Causing Spoilage in Canned Foods (*Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten*. II. Abteilung, 1929, Bd. 78, pp. 161-172), by C. T. Townsend.
396. Studies on the Heat Resistance of Spores of *B. Subtilis* (*Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 1928, Vol. XXVI, pp. 95-97), by O. B. Williams.
397. The Heat Resistance of Bacterial Spores (*Journal of Infectious Diseases*, Vol. 44, No. 6, June, 1929, pp. 421-465), by O. B. Williams.
398. An Exploitation Electrode to Determine the Hydrogen-ion Concentration of Fluids in Living Tissue (*Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, Vol. XV, No. 2, pp. 181- , Nov. 1929), by Henry Ehrenberg.
399. The Commercial Packing of California Mackerel (*University of California Publications in Public Health*, Vol. 1, No. 5, pp. 295-305), by O. W. Lang and R. S. Fellers.
400. Mathematical Solution of Problems on Thermal Processing of Canned Food (*University of California Publications in Public Health*, Vol. 1, No. 2, pp. 15-245), by Charles Olin Ball.

## TROPICAL MEDICINE<sup>1</sup>

By Professor ALFRED C. REED

UNIVERSITY OF CALIFORNIA

JUST what is tropical medicine? Why should people in these United States be interested in such a thing and especially what does it have to do with California and the Pacific Coast and the Pacific Ocean? To answer these questions is to bring up one of the most romantic and interesting fields of human activity which has found a place in modern life. Medicine means more than giving drugs. In fact, drugs have a rather small part in it. Medicine means the prevention, cure and alleviation of disease. The proof of the correctness of this definition is to be found in Webster. And when we qualify this by saying tropical medicine, we mean simply the prevention, cure and alleviation of disease in warm climates. That is a subject big enough, important enough and withal sufficiently spiced with human interest, romance and practical necessity to engage the attention of every person, no matter what his creed, education or politics. All that makes for health preservation and prevention or cure of disease in hot climates comes within the realm of tropical medicine. And then, when we remember that in California especially we have all the essentials of a tropical climate and that many diseases ordinarily considered tropical are found native to this state, we can see that the subject of tropical medicine comes very near home.

In India sacred Mother Ganges receives the devotion of untold millions of her dusky sons and daughters. They come by the hundreds of thousands to bathe in her waters and worship at the thousands of temples bordering her muddy shores. In Benares, the Holy

City of Hind, one sees these hordes, men, women and little children, bathing, drinking, immersing themselves and taking carefully home to their own villages earthenware vessels of the sacred water. Then the scientific Westerner looks closer at the sacred water itself and sees dead dogs, cats and rats floating in it. He sees a vilely dirty, sluggish river receiving the sewage and garbage of great cities; the half-burned remnants of the many funeral pyres on its banks; the effluvia of millions of diseased humans, and its filthy flood he finds to be a warm teeming culture medium transmitting disease in wholesale quantities to these misguided but undoubtedly sincere worshipers. That is why cholera, plague and many another disease also call the Ganges "mother" and here is found one of the world's sources of untold disease, corruption and suffering.

These Hindus do not believe in disease. They do not believe that anything in this world is material or other than illusion and, as a result, they, their children, their friends, neighbors and all with whom they share their cherished earthenware vessels of sacred water from the Ganges go down to death from preventable, unnecessary diseases, which Western science has largely eliminated by study of the natural history of the germs and parasites which cause these diseases, and by means of medically inspected milk and water supply. But the religious beliefs of the populace are an insurmountable obstacle to doing such things in India except to a very limited degree. In fact, the British in India find themselves in somewhat the position of the forty-niner who got the grizzly by the tail and dared not let go. Native superstition, tradition, religious

<sup>1</sup> From the Pacific Institute of Tropical Medicine.

belief—all are deadly foes of sanitary improvement. Education comes slowly. The fight of tropical medicine to prevent preventable disease, to cure curable disease and to alleviate all disease is waged against tremendous odds. This, to be sure, adds to the glory of the combat and leads the forces of science to offer many a sacrifice of brilliant men and devoted women. But it also postpones the day when mankind shall profit by the knowledge now available making for better health, happier human lives and more efficient industrial enterprise. These obstacles, of one kind or another, found in all tropical countries, are a constant lure to the adventurous, lending glamour and romance accompanied by deadly peril to the work of tropical medicine in tropical climes.

In the memory of our fathers, yellow fever was a terrible danger, invading the United States even as far north as Philadelphia and devastating the country with death and ruin in its wake. Commerce stopped. Cities were ruined. The rich and the poor alike fled unsuccessfully from "Yellow Jack." Then, in 1900, came the epochal experiments of the Army Yellow Fever Commission in Cuba, supplying proof that "Yellow Jack" was carried from victim to victim in only one way—by the bite of certain species of mosquitoes. Dr. Carlos Finlay and a few others had suspected this for many years. Drs. Lazear, Carroll, Agramonte and Reed proved it beyond a cavil. They and the brave volunteers who submitted to infection were medical heroes and some became martyrs. Then the late Dr. Hideyo Noguchi after long experiments in South America believed that he found the exact germ which caused yellow fever. But last year Noguchi and three other physicians, working fearlessly in the tropical heat of Africa, found that the cause was not yet discovered and laid down their lives as the price for

knowledge which now seems to open the way for the real conquest of "Yellow Jack." For several years medical sanitation and scientific mosquito control seem to have eradicated the disease from the Western world where its stronghold had before seemed impregnable.

But in the last two years a great and unsuspected source of yellow fever has been found in West Africa, where several varieties of monkeys have been found to be susceptible, and it seems probable that a great animal reservoir exists from which the contagion spreads to man. The disease reappeared last year in Brazil, and a similar situation may also prove to obtain in South America.

An instance of how an ancient and dangerous disease has deserted cold climates and become truly a tropical disease is seen in the case of leprosy. To-day leprosy is rampant across tropical Africa and is wide-spread in nearly every tropical country. Our knowledge of leprosy has advanced along two lines recently. First, effective treatment is possible, so that the active stages can be relieved and the disease arrested. This by allowing patients to be returned to their homes and occupations does away with the terrible hopelessness of leprosy. Second, leprosy is apparently a soil infection contracted through cuts and abrasions of the skin and, while many persons are infected, in the majority it lies dormant just as in the case of tuberculosis. It is thus not contagious from man to man unless under very exceptional circumstances.

There are many great tropical diseases which do not occur endemically in cooler climates but which from time to time may invade the United States or be carried over in patients from the infected regions. Kala-azar, the black fever of China and India, is one of these. It is caused by a microscopic



animal parasite which invades the blood and tissue cells. It is curable by proper treatment. It is carried from man to man by a species of sand-fly. A first cousin of this parasite causes Oriental Sore, so common in the Near East and around the Mediterranean.

African sleeping sickness, which has no relation whatever to what is called sleeping sickness in the United States, is caused by a microscopic animal called a trypanosome which invades the blood stream and central nervous system. It has depopulated vast areas in central Africa and made it impossible for man or animal to live there. These are illustrations of the enormous practical need of tropical medicine and its great importance to-day in warm climates.

In the jungles and rice-fields of many lands insect life swarms in unbelievable abundance. Among these insects, as, for example, mosquitoes, biting flies, sand-flies and ticks, are to be found the carriers and intermediate hosts of many dangerous maladies which are best combated by attacking these so-called vectors through sanitary engineering, protected water and food supplies, insect quarantine and means of avoiding bites. In no other field of medicine are so many specific cures and effective treatments known as in tropical medicine.

We in California are far from being isolated from tropical diseases. We vie with the Ganges, Turkestan, the Trans-Baikal and a spot in Africa in having a focus of bubonic plague in our ground squirrels. Human cases of plague have occurred in California each year since 1908 which were due to this source of infection. Malaria is still a factor in public health in this fair state. Rocky Mountain spotted fever is found and also the plague-like rabbit disease called Tularemia, named after the Tulare swamps where it was first identified. We have many of the numerous forms of fungus infections so common in the

tropics. One of these, coccidioidal granuloma, is similar to tuberculosis and is more common in California than anywhere else in the world. In the realm of intestinal parasites we are also well supplied. Amebic infections are common and many first cousins and relatives. Round worms, tapeworms, leaf-like worms, as well as hookworm, trichina of uncooked pork and even rare tropical filarial infections are often seen. Pellagra, scurvy, beriberi and sprue claim their victims. So that altogether California is a fair field in itself for the practice of tropical medicine. Its position as the western gateway to the Orient and the Pacific islands and its increasing commercial relations with Spanish America serve to increase the variety and abundance of exotic diseases already present.

No disease that ever afflicted mankind can exceed in its toll of death, suffering, invalidism and wrecked nations and civilizations the ravages of malaria. This disease is still the major enemy in the tropics and entitled to be called the "Captain of the Men of Death." From the mangrove swamps and paddy fields of the equatorial belt to our own southern states and west to California, malaria is a pestilence that walketh in darkness, borne by more than thirty kinds of anopheles mosquitoes. Greece and ancient Rome fell before its sway. Its cost in lives and money to-day is stupendous and the problem of its control is far from solved. Sanitation has accomplished wonders in special localities but alone is insufficient to meet the need. Sanitation and mosquito control are terrifically expensive, and the world needs nothing less than the complete eradication of malaria before warm climates will be safe for human work and living.

Dysenteries are caused by many different agents, but the largest groups are due to the dysentery bacilli and to

amebas. Both of these are frequent in the United States, and bacillary dysentery is often seen in children. Undulant fever was originally called Malta Fever because it was discovered in the Island of Malta, where it was caused by germs in the milk of infected goats. It is wide-spread now over the United States, especially on farms and in rural communities. Its germ is transmitted in goat's milk to a minor degree, in cow's milk and by hogs. Milk which has been pasteurized or which is produced in properly inspected dairies is safe. Undulant fever somewhat resembles typhoid and may persist in recurring waves for six months and even a year. Such diseases as infectious jaundice, rat-bite fever and relapsing fever appear from time to time in the United States.

It is hardly realized that rabies (hydrophobia) is wide-spread and dangerous in nearly all tropical countries. This is due to the fact that most native races see no sense in control or care of dogs, which consequently run wild and are usually diseased and half-starved. In Hindu and Buddhist countries especially no dog may be killed, even though no one feeds or cares for it. Under these conditions dog-bite is common and human rabies is a frequent result. Nearly every large tropical city has its Pasteur Institute engaged in the manufacture of the Pasteur treatment which prevents rabies. To these centers people come by the thousands from many miles around. Even in China rabies has been known since early historic times. The only means of prevention known after an infected bite is by the Pasteur treatment. These institutes also manufacture anti-venins against snake-bite and various vaccines and protective sera. Their influence is wide-spread. The value of their ministrations is attested by the great demand on the part of native populations, who know all too well the dangers of these diseases, from

rabies to smallpox, and who really and pathetically appreciate the opportunity of avoiding them.

Problems in untold numbers of disease prevention and health preservation in the Orient and in hot climates are fascinating, practical, new and awaiting solution. Nowhere else do achievement and human service offer greater inducements than here. The scientist in nearly every line is concerned. The nurse, the laboratory technician, the builder, engineer, statesman, administrator, business man, missionary, soldier, sailor, traveler—each and every one has a vital stake in the struggle of tropical medicine to make hot climates safe for man and to make man safe to go into hot climates after their treasures of wealth, experience, science and travel.

Man, doubtless, began his activities on the earth in regions corresponding in warmth to the present tropics. For two reasons he moved away from these languorous lands. In the first place, the hardier, more roving and more intelligent of mankind were led, among other things by their curiosity, to seek cooler localities where, thanks to a tougher fiber, they survived. This more resistant, energetic and adaptive portion developed under the stimulus of changeable climate and the need for securing food and shelter under more difficult conditions. In the second place, insects, poisonous animals, snakes, fungi, bacteria, protozoa and a host of other enemies of man also developed in the warm moisture of the tropics and thus the mass of disease causes became rank and luxuriant so that man could not rise above them. All his racial energy was spent in trying to maintain mere existence, leaving none for intellectual and spiritual progress. But the contest was unequal and tropical man either died out, migrated or remained savage.

To-day, recognizing this old historical record, man is faced by a population in



temperate climates beginning to approach the limits of available food supply. He needs more room for living purposes, more food, more power, more of the innumerable luxuries and necessities associated with culture and intellectual improvement. All these things may be had, one way or another, in the low altitudes of the tropical belt. Therefore, almost instinctively, we are turning to tropical enterprise and development, facing squarely the great problem as to how the tropics can be made safe for civilized man and developed to produce what he needs for still further advancement.

So true is this trend, so clear the need in the eyes of commerce and statecraft, that we find great institutes of tropical medicine established as centers for the education of physicians and nurses, for study of special problems of medical and commercial importance and for treatment of patients. Such is the splendid Tropical Institute of Hamburg, supported by the German government. Here in this great, flourishing German port is a splendid tropical hospital, research plant and school for physicians. Such is the excellent and, in this country, little-known Tropical Institute of Amsterdam supported by the Dutch government as a necessary adjunct for its great colonial empire in the East Indies. Such also the institutions in Paris, Brussels and Rome.

England has four schools of tropical medicine. Of these the largest and best is in London, where twice a year a class of seventy-five physicians spends five months in the graduate study of tropical medicine and hygiene. Near the London school is the wonderful Wellcome Museum of Tropical Medicine, a remarkable teaching exhibit which illustrates graphically with charts, photographs and specimens of its ravages, the cause, transfer, geography, symptoms and epidemiology of each tropical disease.

Such a museum is a splendid nucleus for the teaching of any science, especially tropical medicine. London lives by the sea and its vast sailor population requires a series of hospitals in which all manner of tropical maladies are constantly seen.

In the tropics are many splendid medical centers and hospitals. The United Fruit Company has an unexcelled system of hospitals in the ports of the Caribbean Sea. The Canal Zone and its excellent hospitals administered by the U. S. Army Medical Corps are well known. The Oswaldo Cruz Institute for Medical Research is one of the outstanding features of Rio de Janeiro. Cairo with its hundred-year-old hospital of eight hundred beds is a noted center for wide-spread modern methods of disease control. In addition to the clinical care of patients carried on in the medical stations of the Hadassah movement throughout Palestine, the Hebrew University of Jerusalem is turning out excellent scientific studies. The best medical school in the Near East is at the American University of Beirut.

Bagdad has an excellent hospital, research plant and Pasteur institute, and is opening a medical college. In India there are numerous centers of first-class medical work. The crown of them all, however, is the Calcutta School of Tropical Medicine, founded by Sir Leonard Rogers. This school is unexcelled in the world. It has an unusually able faculty and a large tropical disease hospital. Its service to patients is very large. Twice a week some three hundred lepers come to the leper clinic alone where they are rapidly made non-infectious, so far as possible kept at regular employment, allowed to live with their families and are treated like human beings.

Rangoon, Colombo, Singapore and Kuala Lumpur in Malaya are outstanding for their medical facilities and ser-



vice. Space allows only mention of the various centers in Australia and in Java. Manila has wonderful facilities and material, largely centered in the Bureau of Science and the University of the Philippines. The great Culion Leprosy Station is a monument to American medical science and is being made a memorial to General Leonard Wood. Two millions of dollars are now being raised to make this station wholly adequate and to allow the fullest advances in treatment and prevention of this ancient enemy of man. No more worthy enterprise is before the American public to-day. Professor David P. Barrows, of the University of California, is among the best-informed Americans to-day on Philippine and Pacific Ocean relations. His endorsement and leadership of the Leonard Wood Memorial Fund speaks for itself.

Honolulu, with its modern and complete Queen's Hospital, has an excellent, though small, center for study of tropical medicine. China, the future arbiter of the Pacific, has in Shanghai the medical department of the Central Nationalist University and in Peking the Rockefeller-endowed Peking Union Medical College, both of which are leading in the great field of disease control in China.

So we come back to the United States and find several universities on the east coast developing strong departments of tropical medicine, such as Harvard, Columbia and the Johns Hopkins. Tulane University in New Orleans devotes much attention to this important subject. Everywhere commerce, business and government are recognizing that more and more mankind must live in close relation with, if not in, the tropics.

Until recently there was no center on the Pacific Coast for this type of work. Now in the University of California there has been established the Pacific

Institute of Tropical Medicine at the Hooper Foundation in San Francisco. This is in close association with the University Medical College, but is a separate graduate school. The Tropical Institute of the University of California is organized for three types of work.

(1) Regular courses in tropical medicine and hygiene are given for physicians. Young doctors going out to commercial stations, government service or missionary work in the tropics or the Orient can here secure training in the specialized kind of problems they will have to face. Practicing physicians in those countries can here secure a complete and up-to-date review. (2) Research is carried on in connection with tropical diseases and hygiene, problems arising from shipping and passenger traffic, cargo spoilage and contagious diseases on shipboard. Special studies are being started on tropical drugs and in connection with tropical food supplies. (3) Facilities are provided for the diagnosis and treatment of patients suffering with any kind of tropical, Oriental or exotic disease. In addition to these features, classes are available for non-medical persons intending to live or travel in the tropics or the Orient. Here special instruction is given in simple language on health preservation, personal hygiene and disease hazards in those places.

The stories of Herman Melville, Captain Cook's voyages and the works of Alfred Russell Wallace are literary classics which afford an insight into many practical problems of tropical medicine. It is no small job to avoid sickness in a ship's company, and when contagious disease appears on shipboard difficulties multiply. Yet, no sane person wants to travel on a ship where there is not adequate provision for proper handling of such emergencies. International and United States quar-

antine requirements must be met. These all have to do intimately with tropical medicine.

Quarantine to-day is designed to operate with as little impediment as possible to commerce and passenger traffic. By observance of definite scientific rules, delays are avoided and disease is not introduced. The splendid national quarantine system of the United States, conducted by the federal Public Health Service, is responsible for the fact that in the past generation cholera and yellow fever have been unknown in this country. Smallpox,

leprosy and plague are equally well excluded, but unfortunately these diseases are already endemic in the United States.

Enough has been said to give some idea of the scope and importance of tropical medicine to the world to-day and especially to the west coast of the United States. The preservation of health and the treatment and prevention of disease in hot climates hold a lure for the student, the physician and the scientific worker that is exceeded only by their practical importance for the average citizen.





## SOME NEW ASPECTS OF THE ETIOLOGY AND ENDEMI- OLOGY OF LEPROSY<sup>1</sup>

ERNEST LINWOOD WALKER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco*

Received for publication November 26, 1928

In 1871, eleven years before Robert Koch announced his discovery of the tubercle bacterium, Gerhard Hansen of Norway had observed similar microorganisms in the lesions of leprosy, although their acid-fast character was not recognized until the later development of staining technique. The discovery of the presumptive causal organism, which has led to rapid progress in our knowledge of other infectious diseases, appears to have done little to advance our understanding of leprosy. Notwithstanding the extensive investigations to which leprosy has been subjected, our knowledge of the bacteriology, pathology and endemiology of this disease has made no substantial progress in the half century elapsing since Hansen's discovery. Leprosy still presents some of the most baffling problems in medical science.

### THE BACTERIOLOGY OF LEPROSY

*Varieties of bacteria isolated.* Bacteriologically leprosy appears to occupy a unique position among the infectious diseases of human beings. The lepra bacterium alone, of all definitely identified microorganisms infecting man—be they bacteria, spirochetes or protozoa—has never, it is believed, been successfully propagated outside of the human body, though bacteriologists have repeatedly isolated certain bacteria from cases of leprosy. The reports of attempts to cultivate the lepra bacterium indicate: (1) the infrequency with which positive

<sup>1</sup> This investigation was conducted at the Leprosy Investigation Station in Honolulu, Hawaii, by courtesy of the United States Public Health Service. The author alone is responsible for the results and conclusions of this study. He desires to express here his appreciation of the facilities extended to him by the Surgeon General's Office and for many courtesies from the successive directors and assistants of the Station.

cultures have been obtained, (2) the variety of bacterial forms cultivated, (3) their variable acid-fastness, and (4) the rapid growth of the cultural organisms, once isolated, on ordinary culture media and at room temperature.

It has been a common experience to find that cultures made on supposedly favorable media from materials swarming with lepra bacteria may give wholly negative results. Thus Campana<sup>2</sup> records 500 unsuccessful attempts at cultivation; and Fraser and Fletcher<sup>3</sup> made 373 cultures on various culture media, including those successfully used by other investigators, with material from 32 non-ulcerating cases of nodular leprosy, and incubated these cultures for a period of 9 months—with entirely negative results. Moreover, when some growth is obtained in cultures from leprosy it is usually in such a small percentage as to suggest the possibility of chance contamination. Thus McCoy<sup>4</sup> obtained from 996 cultures (made from 83 specimens of leprosy tissue from 52 patients) only 11 cultures of acid-fast bacteria. And Currie, Clegg and Hollmann<sup>5</sup> say, "After every condition that we are familiar with has been complied with, it is still the exception to obtain a culture of *Bacillus leprae*; but of many tubes inoculated only a small percentage show multiplication of acid-fast organisms."

The suspicion that the organisms occasionally cultivated from leprosy may be contaminants or else adventitious bacteria in the tissues is strengthened by the variety of bacterial forms cultivated and their variable acid-fastness. These cultural forms include coccoids, diphtheroids, rods and branching filaments, each of which may be acid-sensitive (non-acid-fast), or partly or completely acid-fast. Some bacteriologists have cultivated one form, some another, others have cultivated two or more of these forms. Moreover, certain investigators have isolated one form from leprosy and believed that they obtained a development from it of some of the other forms in their apparently pure cultures, or in inoculated animals. These authors have, therefore, suggested that the several cultural forms might be different stages in the life cycle of the lepra organism; and some have

<sup>2</sup> *Riforma med.*, 1889. Ref., *Centralbl. f. Bakt.*, 1889, 6: 701.

<sup>3</sup> *Troisième Congr. Biennal*, 1914, Far Eastern Assoc. Trop. Med., 1913, Saigon, 1914.

<sup>4</sup> U. S. Pub. Health Bull. No. 66, 1914.

<sup>5</sup> U. S. Pub. Health Bull. No. 47, 1912.

maintained that this supposedly pleomorphic organism was not a true bacterium, but a "streptothrix" (e.g., Barannikow,<sup>6</sup> Deycke-Pascha and Reschad-Bei,<sup>7</sup> Kedrowski,<sup>8</sup> Bayon,<sup>9</sup> Beauchamp Williams,<sup>10</sup> Liston and Williams<sup>11</sup>).

However, the apparent absence of these variations in morphology and staining among lepra bacteria in the tissues has led the majority of bacteriologists to conclude that these cultural organisms bear no relation to Hansen's bacterium. And this conclusion is further supported by the fact that these cultural bacteria, once isolated, grow readily and rapidly on ordinary media and at room temperature like saprophytes, and by their failure to reproduce the disease or evoke specific serologic reactions in experimental animals. The present attitude of bacteriologists is that the lepra bacterium is a parasite so exquisitely adapted to its human host that it cannot be propagated on any known artificial medium.

In view of this ambiguous situation, the present investigation was undertaken with alternative purposes: first, to attempt by the use of a great variety of media and techniques to cultivate from leprosy an organism entirely similar to Hansen's bacterium in the tissues; or, in the event of failure in this, to make a thorough bacteriological study of the several types of organisms that have been cultivated repeatedly from leprosy, to try to determine their relation to one another and to the disease.

From 607 lots of pathological material from 194 lepers we made 2363 cultivation experiments. The material included snips from unsterilized skin and scrapings from nasal mucosa, made during the routine examinations of patients; aseptic skin snips; excised leprous nodules; placenta and cord at childbirth; urine; serum aspirated from vesicles and bullae; and blood withdrawn from arm veins during quiescent and reactive stages of leprosy. All of this material proved on microscopic examination, to contain acid-fast bacteria. The number

<sup>6</sup> Centralbl. f. Bakt., 1901, 29: 781.

<sup>7</sup> Deutsch. med. Wchnschr., 1905, pp. 489, 545.

<sup>8</sup> Ztschr. f. Hyg., 1910, 66: 1; III Confr. internat. de la lèpre, Strasbourg, 1923 (Bailière, Paris).

<sup>9</sup> South African Med. Rec., 1913, vol. 11, No. 11.

<sup>10</sup> Brit. Med. Jour., 1911, p. 1582.

<sup>11</sup> Centralbl. f. Bakt., 1913, 56: 100.



of cultures made from these various materials varied from one (in the case of the skin snips and nasal scrapings) to over one hundred (from some of the excised nodules). With the exception of the snips from unsterilized skin, nasal scrapings and urine,<sup>4</sup> most careful aseptic precautions were exercised in collecting and handling the material to prevent extraneous contaminations. The contaminated material was diluted in plate cultures from separate colonies, or planted on Musgrave and Clegg's agar, which inhibits the growth of ordinary bacteria and promotes the growth of acid-fast bacteria.

In the many previous attempts to cultivate the lepra bacterium, a variety of culture media has been used. Apparently, however, no one had systematically tried all kinds of media, and many of the newer media successfully used for the cultivation of the eminently parasitic microorganisms had never been employed for the cultivation of Hansen's bacterium. It was the intention in this investigation to try every type of medium that has been used for the cultivation of bacteria, spirochetes or protozoa; and this plan was as completely carried out as facilities at hand would permit. The following list includes the principle media prepared and used:<sup>12</sup>

*Agar*: Veal infusion, Liebig's extract, liver infusion, peptic digest, testicular, hormone, glycerol veal, glycerol Liebig's, glycerol hormone, McFadden's, semi-solid McFadden's, Sabouraud's, Musgrave and Clegg's triple N, hormone plus cystine, ascitic fluid, blood, cooked blood ("chocolate"). *Blood serum*: Loeffler's, Greenspoon's. *Egg medium*: Dorsett's, Lubenau's, Petroff's raw yolk, inspissated yolk, raw white, inspissated white, inspissated yolk plus trypsin, inspissated white plus trypsin. *Broth*: veal infusion, Liebig's extract, beef heart, hormone, glucose veal, glycerol veal, glycerol Liebig, acetic acid lactose, sodium oleate, charcoal-treated, Avery's, blood glucose, blood glycerol, glycerol brain. *Miscellaneous*: brain medium, ascitic fluid, Noguchi's leptospira medium, agar-saline base of Noguchi's leptospira medium, Noguchi's treponema medium, Locke-ascitic fluid, egg-Locke-ascitic fluid.

In addition to the variety of media, a range of conditions of growth

<sup>12</sup> Each medium was prepared by the standard methods described by the author whose name it bears or by K. F. Meyer and others in a Laboratory Guide published (1925) by the University of California Press.

was provided, including aerobic and anaerobic cultivation, variation in oxygen and carbon dioxide tensions, increase and decrease of surface tension, variation in hydrogen ion concentration, and different temperatures and periods of incubation.

Our results with this extensive series of experiments confirm the experience of previous investigators. The majority of the cultures remained sterile. In none of the cultures did we succeed in growing an organism which was constantly identical in morphology and staining with Hansen's bacterium.

TABLE 1  
*Cultures from leprous material*

KIND OF MATERIAL	LOTS OF MATERIAL	NUMBER OF PATIENTS	NUMBER OF CULTURES	ORGANISMS CULTIVATED		
				Coccoid	Diphtheroid	Actinomycoid
Snips from unsterilized skin.....	277	189	277		6	
Scrapings from nares.....	165	163	165		4	1
Aseptic skin snips.....	83	69	86	1	1	
Leprous nodules.....	33	16	1,546	5	50	
Leprous bullae.....	20	1	134	6	4	
Vesicles of herpes zoosta.....	2	1	6			
Placenta and cord.....	1	1	11			
Blood (acute reaction).....	6	6	42	1	1	
Blood (quiescent cases).....	16	9	40			
Urine.....	4	1	56			
Total.....	607	194*	2,363	13	66	1

\* Several lots of material were sometimes obtained from the same patient.

On the other hand, several types of bacteria, differing from one another in morphology, staining and cultural characteristics, were cultivated repeatedly from certain lots of leprous material. The positive cultures were obtained on a variety of media. These bacteria, which correspond in general with those cultivated by other bacteriologists from leprosy, include coccoids, diphtheroids, rods and branching filaments or actinomycoids (table 1).

One of the most interesting facts concerning the distribution of the positive cultures is not brought out in the table. This is the relation of positive cultures to lots of material. Eleven of the 13 cultures of

the coccoid organism grew from two lots of material—five from one leprous nodule and six from the serum aspirated from a leprous bulla of a case of leprous pemphigus. And of the 66 cultures of diphtheroid organisms, 37 grew from one nodule and 8 from a second nodule of the same patient. The other positive cultures were scattered. Apparently, while material from most leprous lesions contains few or no organisms capable of growth in cultures, an occasional lot of leprous material may contain a number of such organisms. The latter material is usually from cases of active leprosy. The reason for this irregular distribution will be discussed later.

The cultures of coccoid organisms from leprosy (shown in figures 1 and 2) are alike in their cultural, biochemical and morphological characteristics. They grow readily and fairly rapidly (48 hours), after the first cultural generation, on most media. On glycerol agar the growth is moderate to abundant, filiform, convex, smooth, opaque, slimy and more or less chromogenic. The color of the growth varies from gray through pink to dark red. This difference in pigment production is a cell variation, for from plate cultures one can pick gray and red colonies that reproduce their kind with considerable constancy. The individual colonies are small (1 to 2 mm.), round, smooth, convex, with entire edge and amorphous structure. In old cultures well separated colonies may be larger (3 to 5 mm.), and may become flat or conical, or develop a central boss and have a thin serrated or lobulated edge. Biochemically this organism is inert. It is aerobic and does not

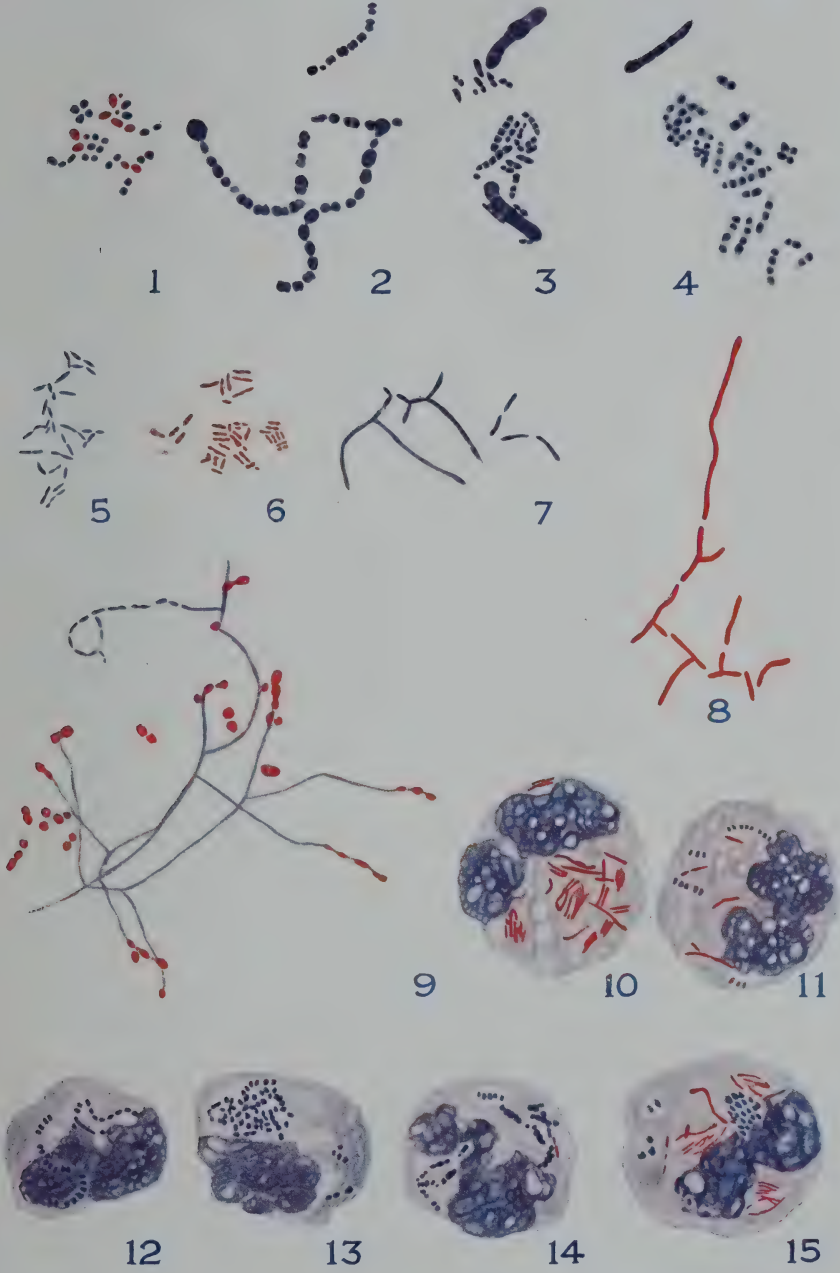
---

These figures were drawn with the aid of a camera lucida, at a uniform magnification of about 1380 diameters, from preparations stained by the Ziehl-Neelsen method. (Marguerite Boyd, artist.)

Figures 1-9: Illustrations of some of the cultural stages in the life cycle of the actinomyces from leprosy. 1. Acid-sensitive and acid-fast coccoid forms. 2. Large acid-sensitive streptococcoid forms. 3-5. Acid-sensitive diphtheroid forms. 6. Acid-fast rods. 7. Acid-sensitive branching actinomycoïd forms. 8. Acid-fast branching actinomycoïd form. 9. Acid-sensitive actinomycoïd form giving rise to acid-fast coccoids ("conidia").

Figures 10-15: Large mononuclear (lepra) cells from the contents of a bulla in a case of leprous pemphigus. 10. Cell containing acid-fast rod stage of the lepra actinomyces (Hansen's lepra bacteria). 11. Cell containing acid-fast rod and acid-sensitive streptococcoid forms of the lepra actinomyces. 12. Cell containing acid-sensitive streptococcoid forms only. 13. Cell containing "nests" of acid-sensitive coccoid forms. 14. Cell containing acid-sensitive segmented diphtheroids and a single acid-fast rod. Fig. 15. Cell containing acid-fast rod and "nests" of acid-sensitive coccoid form of the lepra actinomyces.







ferment any of the ordinary carbohydrates. Gelatin and blood serum are not liquefied and blood is not hemolyzed. Morphologically this organism is typically oval, but it may be nearly or quite spherical; when occurring in chains the individual cocci are frequently flattened transversely to the axis of the chain. They vary considerably in size. They occur singly, in pairs, or in shorter or longer chains like streptococci, and sometimes appear encapsulated. This organism is gram positive and, on glycerol agar, acid-sensitive (non-acid-fast), but on certain media a variable proportion or all of the cells may become acid-fast (Ziehl-Neelsen stain). This chromogenic coccoid organism was probably first cultivated by Rost<sup>13</sup> in 1904.

The cultures of diphtheroid organisms from leprosy show considerable variation in cultural and morphological characters. Several authors, among whom are Kedrowski<sup>8</sup> and Zironi,<sup>14</sup> have called attention to the variable characteristics of these diphtheroids. Three chief varieties with intermediate forms can be distinguished among our cultures. The first of these (shown in figure 3) appears to be the diphtheroid that has been most frequently cultivated from leprosy, probably first isolated in culture by Bordoni-Uffreduzzi<sup>15</sup> from the bone marrow of a leper post mortem, and subsequently cultivated by many bacteriologists from leprous materials. I have cultivated this organism 28 times from 23 lepers. On glycerol agar, growth is somewhat slow (48 to 96 hours), is moderate to abundant, beaded, raised, verrucose, butyrous, dull, opaque and grayish white in color. The individual colonies are large (2 to 5 mm.), more or less irregular, umbonate, with serrated or lobulated thin margin from which secondary colonies may arise, amorphous in structure and grayish white in color. This diphtheroid is aerobic. Glucose is fermented with the production of acid but no gas; saccharose, lactose, maltose, mannite and glycerine are not fermented. Gelatin and blood serum are not liquefied, and blood is not hemolyzed. It is characterized by its large but variable size and its extreme pleomorphism; clubbed and irregularly swollen forms are common. It stains segmentally with Loeffler's

<sup>13</sup> Indian Med. Gaz., 1904, May.

<sup>14</sup> Boll. d. Inst. Sieroterapico Milanese, 1920, Dec., p. 381; Trop. Dis. Bull., 1923, 20: 494.

<sup>15</sup> Ztschr. f. Hyg., 1888, 3: 178



methylen blue, and may show large metachromatic granules; it is gram positive; and it may contain acid-fast granules or segments, especially in the first cultural generation.

The second variety of diphtheroid (shown in figure 4) was cultivated once from the blood of a leper during acute reaction, and two atypical cultures changed spontaneously to this variety during cultivation. It grows rather slowly on glycerol agar (48 to 96 hours); the growth is moderate, spreading, flat, verrucose, dry, brittle, dull, opaque, and ochreous yellow in color. The individual colonies are of medium size (1 to 2 mm.), irregular, umbonate, with serrated or lobulated thin margin from which secondary colonies may arise. It is aerobic. It ferments glucose, saccharose, maltose and glycerol, but not lactose and mannite, with the production of acid but not gas. It does not liquefy gelatin or blood serum, and blood is not hemolyzed. Morphologically this diphtheroid resembles the first variety, but it is usually less pleomorphic and shows no acid-fast granules or segments.

The third variety of diphtheroid (shown in figure 5) was cultivated in 37 of 50 cultures made from one leprous nodule and once from an aseptic ear snip. On glycerol agar, growth is fairly rapid (48 hours), moderate, filiform, raised, smooth, glistening, translucent becoming opaque, slimy, and pale yellow or brownish yellow in color. The individual colonies are small, punctiform or round, smooth, convex, with entire edge and amorphous in structure. This diphtheroid is aerobic. It ferments glucose and glycerol, but not saccharose, lactose, maltose or mannite, with production of acid but no gas. Gelatin and blood serum are not liquefied, and blood is not hemolyzed. This organism is a slender rod of medium length, and has only slight diphtheroid characters. Stained with Loeffler's methylen blue it shows little or no segmentation, but may have metachromatic polar granules. It is gram positive but acid-sensitive.

The actinomycoid type of organism (shown in figures 7 to 9) was isolated once in plate culture from the scrapings from the nasal mucosa of a leper. Culturally and biochemically this organism is indistinguishable from the coccoid organism previously described. Morphologically the growth consists of long rods and short filaments of varying thickness, which frequently are branched. The branches may be clubbed like diphtheroids. These rods and filaments may be either acid-sensi-

tive or acid-fast; sometimes the same filament has both acid-sensitive and acid-fast branches. The filaments frequently become segmented and break up into coccoid elements. This actinomycoid organism appears to have been first cultivated directly from leprosy material by Deycke-Pascha and Reschad-Bei<sup>7</sup> in 1905, although this form was observed in transplant cultures from leprosy as early as 1899 by Baranikow.<sup>16</sup>

*Relationship of the bacteria cultivable from leprosy.* What is the relation, if any, between these several diverse types of bacterial organisms cultivable from leprosy? According to the older bacteriology which considered bacterial species as relatively fixed types, any relationship apart from a remote evolutionary one would be inconceivable. In recent years, however, this belief in the immutability of species has become untenable, and there is now general recognition of what is variously designated as variation, dissociation, mutation or life cycles of bacterial species. Yet even the most ardent supporter of life cycles of bacteria might hesitate to accept developmental relationship of such diverse bacterial forms as those cultivable from leprosy. The proof of such relation would be the experimental transformation of the several types one into another.

In studying life cycles of bacteria, the use of single-cell rather than single-colony cultures has been considered indispensable to insure purity of bacterial strains. Many methods for the isolation of single cell cultures have been devised (cf. Hort<sup>17</sup>). The recent theory that some, perhaps all, bacteria have an ultra-microscopic or filterable stage introduces a possible fallacy into all of these methods. Furthermore, the fact that a culture has originated from a single bacterial cell does not guarantee that it will remain a pure strain through a long series of transplants and repeated examinations; extraneous contamination is a possibility at every step in the process, and in my experience is a more frequent source of error than mixed initial cultures. In fact, I am convinced that proof of life cycles and the relation thereto of suspected cyclo-stages of bacteria depends on the ability to repeat the transformation of one stage to another in strains from different sources, and to reverse the cycle. Therefore, I have worked with single-colony cul-

<sup>16</sup> Centralbl. f. Bakt., 1899, 26: 113.

<sup>17</sup> Jour. Hyg., 1920, 18: 369.

tures and checked the results by these criteria. As examples of the experimental transformation of these morphologic and tinctorial types of lepra bacteria one to another, the following protocols are transcribed in somewhat modified form from my notes.

The coccoid type of organism grows on glycerol agar as an oval or round bacterium, singly or in pairs and is acid-sensitive. Transplanted to Noguchi's leptospira medium, it tends to grow into streptococcus-like chains. On Musgrave and Clegg's agar this organism maintains its coccoid morphology, but a greater or less proportion of the coccoid elements become acid-fast. In dextrose broth it develops into pleomorphic diphtheroids, often very large, sometimes with radial arrangement of large clubbed forms, and is acid-sensitive. Transplanted into litmus milk this coccoid tends to grow into branching filaments, that may be either acid-sensitive or acid-fast. On inspissated egg yolk, and to a lesser degree in litmus milk, coccoid, rod, diphtheroid, filamentous and branching forms, both acid-sensitive and acid-fast, are found together in the same culture. By transplanting on appropriate medium for the development of the several forms for a number of generations and then making plate cultures, it has been possible to isolate rod, diphtheroid and branching filament colonies from the original coccoid culture, which may breed true, although there is sometimes a tendency to revert to the coccoid type.

The first variety of diphtheroid grows on glycerol agar as a large, pleomorphic, segmentally staining bacterium, which is mostly acid-sensitive but occasionally shows metachromatic or acid-fast granules. On appropriate media, especially those containing unheated blood serum or ascitic fluid, it assumes the coccoid form. For a long time this organism resisted all attempts to transform it into an acid-fast strain. Finally, on inspissated egg yolk, two strains of this diphtheroid from different sources developed acid-fast coccoid forms. These acid-fast coccoids cultivated in litmus milk developed rods and branching filaments.

The second variety of diphtheroid grows on glycerol agar as a rather large, pleomorphic, segmented, acid-sensitive bacterium. On Musgrave and Clegg's agar it may assume the coccoid form, and in certain of these cultures some of the coccoid elements become acid-fast. The coccoid strain was isolated in pure culture by plating and selection of



colonies. Conversely it has been possible to transform the coccoid strain cultivated from the blood of a leper into this variety of diphtheroid by growing it on egg yolk, plating and selecting the characteristic diphtheroid colonies.

The third variety of diphtheroid has a morphology similar to Hansen's bacterium, but is acid-sensitive. It developed at times a coccoid morphology on ascitic agar, egg yolk and in Noguchi's leptospira medium, but remained strictly acid-sensitive. Planted finally on potato medium it assumed in part a coccoid morphology, and a few of the coccoid elements were acid-fast. Transplanted from potato to inspissated egg yolk this culture became completely coccoid and acid-fast, and is indistinguishable from the coccoid organism cultivated from the blood of a leper and from the serous contents of a leprous bulla. After 15 months' cultivation on glycerol agar this diphtheroid changed spontaneously to the coccoid type of organism. Conversely, a coccoid strain cultivated from the blood of a leper has been converted into this variety of diphtheroid by cultivating on egg yolk and isolating the diphtheroid in plate culture.

The branching filamentous organism, on isolation in pure culture on glycerol agar, grew in the form of long rods and short branching filaments, some of which were acid-fast. After being transplanted a few times on the same medium, it became coccoid and completely acid-sensitive. Later the culture, still coccoid in morphology, dissociated into red and yellow colonies, which were isolated in pure cultures. After about 16 months of cultivation, the yellow colony culture was found to have developed the colony and morphologic characteristics of the third variety of diphtheroids. This strain is interesting because of its instability, having developed spontaneously on a uniform culture medium all three morphologic types cultivated from leprosy. Conversely, all of the coccoid and diphtheroid types have been transformed into the filamentous type by cultivation on appropriate media.

It should not be inferred from these protocols that the transformation of one stage to another in this lepra organism is merely a matter of transplanting to a particular culture medium, and that one type of modification develops invariably on a certain kind of medium. On the contrary, such modifications may appear only occasionally and not always of one kind on the same medium. All that we can say is that

some media more than others cause variations in this organism, and that certain media tend to produce variations in certain directions. These variations may affect some or all of the organisms in the culture, and they may be temporary or permanent. Repeated transplants on the same medium tend to fix these variations so that they will breed true.

The manner of transformation of these several types of organisms one to another, in spite of their wide diversity, appears to be relatively simple. Division only of the protoplasmic contents, not involving the capsule, in the short coccoid chains gives rise to the segmented diphtheroids, while continued growth of the potential coccoid chain without divisions produces the rod and filamentous forms, which may branch. Conversely, the segments of the diphtheroids and filaments become rounded to form coccoid chains, or fall apart as isolated coccoids. In some cases the coccoid elements thus formed appear to be segmented off or discharged from the end of the sheath-like capsule of the filament (see, e.g., figure 9). These coccoid forms constitute the so-called conidia of the actinomyces. These "conidia" differ from true spores in that they are capable on suitable media of continuous multiplication as such and independent of the filamentous form. The nature of the change by which the organism becomes transformed from acid-sensitive to acid-fast and *vice versa* is obscure. It appears to be independent of lipoids in the culture medium or of the presence of a capsule about the organisms.

It has thus been found possible to transform each of the several types of organisms cultivable from leprosy into the other types, to reverse the cycle, and to change them from acid-sensitive to acid-fast and *vice versa*. Consequently the evidence appears conclusive that in these several morphologic types we are dealing with different forms of one organism, which is extraordinarily pleomorphic and facultatively acid-fast. These results confirm experimentally the suspicions of earlier investigators.

Are these variations in morphology and staining reaction in this cultural organism from leprosy simply environmental changes in response to different culture media, or are they true cyclo-stages in a primitive life cycle? Since sometimes one and sometimes another morphologic type is isolated from leprosy on the same kind of culture

medium, and since in the experimental transformations of one type to another on special media the new type develops not always but only occasionally, these variations do not seem to be simple environmental changes. This conclusion is further supported by the fact that these experimentally produced forms can be isolated in pure culture, which breed true on ordinary media. It would thus appear that in this cultural bacterium from leprosy we are dealing not only with an extremely pleomorphic and facultative acid-fast organism, but one in which the different morphologic and tinctorial forms represent a definite though primitive life cycle.

The systematic position of this pleomorphic organism cultivable from leprosy in the classification of the fission fungi is of interest and indirectly of great practical importance. Its peculiar characteristics do not correspond with those of any of the true bacteria with which we are acquainted. On the other hand, the extreme pleomorphism, facultative acid-fastness, difficulty of primary isolation from the tissues, free and rapid growth when once isolated in culture, and difficulty of experimental infection do agree with the characteristics of a group of so-called higher bacteria, the genus *Actinomyces*. This genus, as now constituted by the Society of American Bacteriologists, is a somewhat heterogeneous group. It includes the organism of bovine actinomycosis, of certain varieties of mycetoma, pulmonary and generalized actinomycoses of man, as well as a large number of wholly saprophytic species. At one end of the series stand the typical filamentous, acid-sensitive species like *Actinomyces bovis*; at the other end we have the less filamentous species which tend to break up into rod and coccoid elements and which are facultatively acid-fast, such as *Actinomyces asteroides* and *A. caprae*. It is possible that this group should be split up and the latter forms placed in a separate genus intermediate between *Actinomyces* and *Mycobacterium*, or perhaps the facultative acid-fast species should be placed in the genus *Mycobacterium* and the definition of the latter genus enlarged to cover the inclusion. In any event, the characteristics of the organism cultivable from leprosy place it unquestionably in the genus *Actinomyces* as now constituted, and closely ally it to the other facultative acid-fast species of this genus.



## THE ETIOLOGY OF LEPROSY

The etiologic relation of Hansen's bacterium to leprosy rests on circumstantial evidence, since all attempts to fulfill Koch's postulates have failed. The inability to transmit an infectious disease by inoculation of material from its lesions swarming with the presumptive specific microorganism constitutes one of the enigmas of leprosy.

Apparently the first attempts to transmit leprosy from man to man by the inoculation of leprosy material were made by the celebrated Norwegian leprologist, Danielssen, from 1844 to 1856. (At that time the lepra bacterium had not been discovered, and the human inoculations were made in attempt to prove that leprosy was not an infectious disease.) During these twelve years, according to Hansen,<sup>18</sup> Danielssen made more than seventeen inoculations of leprosy tissue, blood and exudates into himself and other persons. Between 1868 and 1875 Profeta and Cognina (Hansen<sup>18</sup>) inoculated themselves and eight other persons with leprosy material. In 1867 Bargilli (Hansen<sup>18</sup>) inoculated two persons. Mouritz<sup>19</sup> inoculated with leprosy material fifteen male and female non-leprosy kokuas (helpers), at the leper settlement on Molokai between 1883 to 1887. And in 1884 Arning (Mouritz<sup>19</sup>) inoculated leprosy tissue into a condemned murderer at Honolulu. In addition to these forty-five inoculations of leprosy into healthy persons, Hansen<sup>18</sup> attempted to transplant leprosy nodules into two cases of neural leprosy, and Mouritz<sup>19</sup> made more than 100 inoculations of leprosy material into healthy skin areas of lepers.

Of all these inoculations of leprosy material into men and women, all but one failed absolutely to convey infection, and the apparently successful infection is open to criticism. This latter case is that of the condemned murderer, Keanu, inoculated by Arning in 1884. This inoculation was in reality a tissue transplant of a leprosy nodule, described as the size of a small hen's egg. This nodule was excised from a leper, inserted and sutured in an incision in the arm of the criminal. Twenty-five months after this transplant Keanu showed clinical evidence of leprosy, and died of the disease eight years and fifty days after

<sup>18</sup> *Lepra-Confr. z. Berlin*, I, Zweite Abt., 1897, p. 1; *Norsk Mag. f. Laegevid.*, 1874, Heft 9; *Virchow's Arch.*, 1880, 79: 32.

<sup>19</sup> *Honolulu Star-Bulletin*, Ltd., 1916.

the operation. This one apparently successful inoculation has been criticised on three grounds: the experiment took place in a notably endemic region, Keanu was of a highly susceptible race, and his son and two other near relatives are said to have been lepers.

If leprosy be an infectious disease caused by Hansen's bacterium, what is the explanation of the repeated failures to transmit the disease by inoculation of leprous material? The reason for these failures may be twofold. In the first place, difficulty of artificial infection is characteristic of some of the actinomyces. This difficulty may be due to certain peculiar requirements for infection, such as lacerated wounds or the presence of other bacteria to prepare the "soil," as is the case with tetanus. Secondly, there is considerable evidence that the majority of the enormous number of lepra bacteria present in the body of lepers are dead. Not only will they not infect on inoculation nor grow in cultures, but they fail to proliferate and produce lesions in their own host. Many leprous lesions are not progressive and may be retrogressive. Lepra bacteria are brought to the skin and localized in it by injuries, such as blisters, burns and bruises; but leprous lesions rarely result, the acid-fast bacteria persisting for a time and then slowly disappearing. Certain internal organs, such as the glands and spleen, may be swarming with lepra bacteria without gross lesions. In fact, it would appear as if leprosy were a disease of multiple lesions and enormous numbers of the specific bacteria, but usually with few foci containing viable bacteria. From time to time some of these viable foci may light up with rapid proliferation of the organisms, resulting in "showers" of the acid-fast bacteria distributed by the blood or lymph circulation more or less throughout the body. These may initiate new crops of lesions; but for the most part they are rapidly killed off by the defensive mechanism of the body, although preserved from disintegration by their waxy capsules. As a result of the repetition of these processes, the body of the leper comes to contain the enormous number of acid-fast bacteria characteristic of advanced cases, which are more or less intact but incapable of multiplication. Such a conception accounts for the number of acid-fast bacteria in the tissues of lepers without corresponding lesions, and for the clinical course of the disease; it explains why most samples of these organisms fail to grow in cultures, while an occasional lot of material will give an abundant growth;

and it accounts for the probably complete failure to transmit the infection by experimental inoculation. Positive cultures and infections from leprous material would depend upon chance selection of material from viable foci. The infection of the criminal Keanu may have been a true experimental infection from such a viable focus. And there are records of several accidental wound infections of surgeons and pathologists during operations or necropsies on lepers, in some of which the primary lesion developed at the site of the infected wound.

It should be recognized, however, that experimental or accidental inoculations of man with leprous material, even if successful, do not prove the etiologic relation of Hansen's bacterium to leprosy; actual proof could only be obtained by the experimental production of leprosy in man or other animals with pure cultures of this organism. In the absence of this experimental proof, the evidence in support of this relation is the constant association of Hansen's bacterium with leprosy, its absence from the lesions of other diseases, the enormous number of these organisms in most leprous lesions, and the similarity of the lepra bacterium and leprosy to the tubercle bacterium and tuberculosis. This evidence has been generally accepted as conclusive, and the presence of Hansen's bacterium in the lesions is now regarded as the final word in the diagnosis of leprosy.

Hansen's bacterium, present in the lesions of lepers and the accepted cause of leprosy, is, I believe, one stage in the life cycle of the pleomorphic and facultative acid-fast actinomyces cultivable from leprosy. Actual proof of this relationship, like that of the etiologic relation of Hansen's bacterium to leprosy, may be difficult. Attempts to infect animals with cultures of this actinomyces have failed or been inconclusive. Such doubtful results as have occasionally been obtained consist of temporary nodules developing at the site of inoculation or at places where the injected bacteria may have been carried by the blood or lymph circulation. Fraser and Fletcher<sup>3</sup> claim to have produced similar lesions in animals by the inoculation of killed cultures of acid-fast bacteria. No one apparently has produced progressive and metastatic lesions similar to the natural disease, nor transmitted the infection through a series of experimental animals. The latter failure may be due to improper choice of experimental animals and to insufficient time of experimentation. Nor do serologic reactions give us much help in



the identification of the specific cause of leprosy. Serologically leprosy gives group reactions, which are more or less common to all acid-fast bacteria, but specific for none.

Notwithstanding the difficulties of proof, the evidence in support of the identity of Hansen's bacterium with the cultivable actinomyces is convincing. One or another stage of this actinomyces is the only organism that has been cultivated repeatedly from leprosy by competent bacteriologists in every part of the world. It has been grown from every type of lesion containing Hansen's bacterium, from the internal organs, the bone marrow and leprous exudates. It is cultivable from the circulating blood of lepers during acute phases of the disease. Thus Reenstierna<sup>20</sup> obtained growth of this organism in all three flasks of media inoculated with blood withdrawn from a "florid" case of leprosy. I have succeeded in cultivating it from the blood of two out of six cases during acute reactions, while blood cultures made from fifteen lepers during the quiescent phase of the disease remained sterile. That this cultivable actinomyces is not a skin contaminant or an adventitious organism in the tissues is amply demonstrated by the enormous number of cultures being constantly made from the tissues, blood and exudates of non-lepers the world over without encountering this organism. In other words, the identity of this cultivable actinomyces with Hansen's bacterium is supported by the accumulated bacteriological evidence of over half a century.

The cultivable actinomyces does at times assume in cultures the morphology and staining of Hansen's bacterium in the tissues. On the other hand, the usual absence of the acid-sensitive cultural stages of this actinomyces from the lesions of leprosy might be considered as evidence against its identity with Hansen's bacterium. Even this absence, if true, would not necessarily prevent such identity, since Hansen's bacterium might be the sole form of this organism developing in the tissues. However, there are a number of observations of acid-sensitive forms in leprous lesions, such as those of Babes,<sup>21</sup> Herman,<sup>22</sup> Williams,<sup>10</sup> Biehler,<sup>23</sup> Zironi,<sup>14</sup> Wayson<sup>24</sup> and others. In the following

<sup>20</sup> Arch. f. Dermat. u. Syph., 1913, vol. 116, Heft 3.

<sup>21</sup> Lepra-Confr. z. Berlin, 1897, p. 137.

<sup>22</sup> Lepra-Confr. z. Berlin, 1897.

<sup>23</sup> Lepra Bibliotheca Internat., 1912, 12: 187.

<sup>24</sup> Personal communication, 1927.

case the presence of an acid-sensitive cultural stage of this actinomyces, not only in a leprous lesion but in lepra cells, was established microscopically and the identity of the organism confirmed by cultivation and bacteriologic study:

In the sero-purulent contents of a bulla in a case of leprous pemphigus, removed aseptically in a sterile syringe, there were found many short chains and groups of acid-sensitive coccoids and a few diphtheroid organisms. These occurred for the most part in the lepra cells; the occasional free forms may have resulted from the rupture of cells in making the smear preparations. In the cells these acid-sensitive organisms were scattered through, or collected into compact "nests" in the cytoplasm, sometimes alone, sometimes associated with groups of acid-fast lepra bacteria; in other cells the acid-sensitive coccoids were intermingled with the acid-fast lepra bacteria. Some of the cells were completely filled with these acid-sensitive organisms, but for clearness of delineation only the cells containing a few organisms are represented in the figures (see figures 10-15). Cultures made from this material developed a growth of the acid-sensitive coccoid organism, which was identical with that cultivated from other leprous material, becoming acid-fast on appropriate media, and being dissociable into diphtheroid, rod and branching filamentous forms. This acid-sensitive coccoid form present in this leprous bulla may be the actively multiplying stage of the lepra bacterium in the tissues. In any event, this case supplies evidence that would appear to clinch the argument for the identity of the cultivable actinomyces with Hansen's bacterium.

#### THE ENDEMOLOGY OF LEPROSY

Leprosy is probably one of the most ancient of human diseases, and is of world-wide, although irregular, distribution. It has spread and increased to a maximum in certain countries only to decline and disappear in later times; in other regions small circumscribed foci of infection have persisted for generations without spreading to surrounding territory. It has been introduced abundantly into still other countries and failed utterly to become endemic. Its distribution is restricted only to a limited degree by climate or race; its spread does not appear to be promoted by density of population. What, then, is the mode

of infection in leprosy and its method of dissemination? In the past, belief in contagion has alternated with acceptance of hereditary transmission, with interspersings of the fish hypothesis of Hutchenson and the attempt to incriminate insect carriers. The hereditary, fish and insect hypotheses have fallen under the weight of contradictory evidence. Since the discovery of Hansen's bacterium, the belief in contagion has been in the ascendency, but obviously the evidence of contact transmission is not conclusive. The conception of an actinomyces etiology of leprosy introduces an entirely new aspect into the problem.

According to our present knowledge the actinomyces as a group are saprophytes, living in the soil and on vegetation. Even those species parasitic in, and pathogenic for, man and other animals are believed to be soil organisms that infect animals through soil-contaminated wounds. In other words, these latter species are only facultative parasites, like a number of groups of the lower fungi.

This biologic characteristic of the actinomyces has suggested the possibility of the soil origin of the actinomyces of leprosy. A bacteriologic study of the soil of Hawaii was therefore undertaken, with samples of soil collected throughout the island of Oahu, which is probably representative of the archipelago. The samples included all varieties of surface soil, from end to end and from side to side of the island, and from sea level to the top of the mountain; they also included a few samples of herbaceous vegetation and animal excrement. The samples, consisting of from 100 to 200 grams of soil, were collected in sterile Erlenmeyer flasks of 250 cc. capacity, to which was added sufficient sterile distilled water to saturate the soil and extend about 1 cm. above the surface. The samples were then incubated at 37°C. After a week or two they were examined for acid-fast organisms by removing loopfuls of the scum from the surface of the water, spreading them on a slide, and staining the dried smears by the Ziehl-Neelsen method. At the end of two weeks the flasks were removed from the incubator, kept at room temperature, and examined thereafter at intervals.

By this simple technic acid-fast organisms were found in 98 per cent of fifty samples studied. In these mixed cultures of soil bacteria, the acid-fast organisms were usually few, but occasionally numerous. In



morphology they varied from coccoid to branching filaments. From the results of this soil survey it would appear that acid-fast bacteria-like organisms are generally distributed in the surface soil on the island of Oahu and presumably throughout the Hawaiian Islands, as well as elsewhere.

To determine the identity of these acid-fast organisms in the soil, it was necessary to isolate them in pure culture. This was somewhat difficult on account of the great predominance of other soil bacteria and the presence among them of kinds whose growth covers the whole Petri plate culture. However, by repeated dilution and plate cultivation, the isolation of pure cultures of acid-fast organisms was accomplished from six representative samples, that included soils from different localities, green alfalfa and horse dung.

A bacteriologic study of these pure cultures of acid-fast soil organisms has shown that they are all of one and the same species, and that this species is extremely pleomorphic, developing coccoid, diphtheroid, rod and filamentous forms, of which all are facultatively acid-fast. Comparative studies of the cultural, biochemical, morphological and tinctorial characteristics of this soil organism and of the organism cultivable from leprosy has established the probability that they are identical species of the genus *Actinomyces*. All of our drawings of the lepra organism serve equally well to illustrate the life cycle of the soil actinomyces. The bearing of this discovery on the endemiology of leprosy is obvious. One is thus led to the final conclusion that leprosy is primarily an infection from the soil, probably of wounds, with this facultative parasitic actinomyces. This does not exclude the possibility that leprosy might sometimes be transmitted by direct or indirect contagion, though it is probable that most lepra bacteria shed from the bodies of lepers are dead.

According to this soil theory of the endemiology of leprosy the specific actinomyces, like the organism of tetanus, is probably of wide but irregular distribution in the soil. Extended soil surveys have not yet been made to determine its range, but I find it present to a certain extent in the soil of California; and the acid-fast bacteria that have been isolated from milk, butter, hay and cow dung in various parts of the world may be the same organism. With this distribution of the soil actinomyces, the incidence of infection in leprosy might, as in the

case of tetanus, depend upon many factors such as: the local prevalence of the organism in the soil, vocational contact with the soil, clothing habits with especial reference to the feet, work tending to produce wounds, nature of the wounds, developmental stage of the actinomyces contaminating the wound, primary infection of the wounds with other bacteria, and local and individual customs of caring for wounds.

There is also some evidence in support of the belief that infection with the lepra organism may not necessarily result in the development of the disease. Thus Serra<sup>25</sup> repeatedly demonstrated lepra bacteria in the glands of contacts, although these individuals showed no evidence of the disease. In some unpublished work done several years ago, I found acid-fast bacteria in the subcutaneous tissues or spleen of a large proportion of wild rats, although none of them showed symptoms of rat leprosy and the incidence of rat leprosy is extremely low. Serra<sup>25</sup> also called attention to the analogy between leprosy in man and rats, in that in the latter bacilli may for a long time (perhaps for life) be present in the glands without setting up a general infection. That there is a racial variation in susceptibility to leprosy is indisputable. Climatic, economic, social and hygienic conditions undoubtedly play a rôle in its incidence. Leprosy was endemic and prevalent in Western Europe during the Middle Ages, but has practically disappeared in modern times; and while there is still considerable leprosy imported into certain parts of this region, it fails to spread. Likewise, leprosy introduced into the United States did not become endemic (see page 192). The possible failure of infections with the lepra organisms to develop leprosy among people of higher civilization in temperate climates has an analogy in entamoebic dysentery. Infections with *Entamoeba histolytica* are now known to be not uncommon in these localities, but entamoebic dysentery is rare—that is, persons have a latent infection but do not develop the acute disease.

In the absence of successful experimental infections to furnish actual proof of either the soil or the contagion theories of the dissemination of leprosy, let us examine the relative agreement of these two theories with the established facts of the incidence and spread of leprosy.

<sup>25</sup> III nota. Gior. ital. Dermat. e Sifil., 1926, 67: 1109; Trop. Dis. Bull., 1927, 24: 213.

Supporters of the theory of contagion maintain that direct contact can be traced between many cases of leprosy: so can direct contact be traced between cases of malaria, yellow fever and ancylostomiasis, though we know that in none of these cases is the transmission by contagion. Moreover, direct contact in leprosy can usually be traced in less than half of the cases (29 per cent in Denny's<sup>26</sup> series of 10,425 cases in the Culion Leper Colony in the Philippine Islands). Contagionists stress the importance of intimate and prolonged contact, such as occurs between parents and their children. Probably the most extensive data on this aspect of the subject are again those collected by Denny<sup>26</sup> (table 2). From this table it will be seen that the proportion of leper parents to infected children is lower than all the

TABLE 2  
*Leprosy in families of lepers (Denny<sup>26</sup>)*

	PER CENT
Brothers and sisters.....	35
Cousins.....	27
Children.....	11
Parents.....	7
Husband and wife.....	1

other proportions except that of husband and wife, and also that the more intimate associations, such as those between husband and wife and between parents and children, are least productive of contagion; while leper cousins would be accountable for more infections than all the closer relations put together, brothers and sisters excepted.

It is claimed that the segregation of lepers has decreased its incidence and would, if efficiently carried out, exterminate the disease. Norway, Hawaii and the Philippine Islands are cited as outstanding examples of the effective results of segregation. Leprosy, once prevalent, is disappearing in Western Europe, and Norway may be looked upon as one of the last dwindling foci of the disease. That the imperfect segregation of lepers in the Middle Ages would account for the disappearance of leprosy in Western Europe seems improbable when we consider

<sup>26</sup> Jour. Amer. Med. Assoc., 1917, 69: 2171. See also J. N. Rodriguez: Philippine Jour. Sci., 1926, 31: 115.



the indifferent results of more rigidly and scientifically enforced segregation of modern times. Leprosy is a disease of lower civilization, and its disappearance from Western Europe was probably due to improved economic, social and hygienic conditions. Europeans may also have

TABLE 3  
*New cases of leprosy segregated in Hawaii\**

FIVE-YEAR PERIODS	NEW CASES	FIVE-YEAR PERIODS	NEW CASES
1868-1872	377	1897-1901	452
1873-1877	643	1902-1906	448
1878-1881	447	1907-1911	339
1882-1886	624	1912-1916	338
1887-1891	1,410	1917-1921	488
1892-1896	709	1922-1926	386

\* The figures in this table from 1868-1921 were taken from Hasseltine,<sup>27</sup> and from 1922 to 1926 from the Reports of the Board of Health, Territory of Hawaii.

TABLE 4  
*Number of new cases of leprosy segregated in the Philippine Islands\**

YEAR	NUMBER OF LEPERS SEGREGATED	YEAR	NUMBER OF LEPERS SEGREGATED
1906†	802	1916	966
1907	690	1917	613
1908	1,603	1918	973
1909	1,378	1919	551
1910	930	1920	605
1911	889	1921	873
1912	964	1922	1,311
1913	795	1923	1,109
1914	859	1924	860
1915	555	1925	723

\* The figures in this table from 1906 to 1920 inclusive were taken from Albert,<sup>28</sup> and from 1921 to 1925 from the Reports of the Philippine Health Service.

† July to December.

developed a racial resistance to leprosy, due to repeated inoculations of small doses of the soil actinomyces giving rise to latent infections, which would be analogous to the resistance to tuberculosis of the more

<sup>27</sup> U. S. Pub. Health Bull. No. 130, 1922, pp. 1-24.

<sup>28</sup> Jour. Philippine Islands Med. Assoc., 1921, 1: 133.

civilized races. Leger<sup>29</sup> concludes that some degree of immunity to leprosy must have been acquired by the inhabitants in endemic regions, leading first to the manifestation of the disease in its less virulent nerve type. He calls attention to the practical disappearance of leprosy from Europe before modern hygiene had advanced sufficiently to be considered the cause. For the same reason leprosy re-introduced into these regions, as it has been repeatedly, fails to become endemic. In Norway the downward trend of the incidence of leprosy was apparent as long ago as 1856 when only about 10 per cent of the lepers were segregated. As late as 1920 only about 60 per cent were segregated. During all this time the downward curve of the incidence of leprosy has not been markedly altered.

In Hawaii the segregation of lepers has been practiced since 1866. At first it was doubtless imperfect, but in recent years it has been well enforced. The new cases of leprosy segregated from 1868 to 1926, according to the latest figures available, are given in table 3. These figures do not disclose an impressive decrease in incidence of leprosy after sixty years of segregation. There probably has been some decrease since the period 1892-1896, but this decrease can be correlated with the decrease of the Hawaiian race, which appears to be on the way to extinction, as pure and part Hawaiian furnish about 80 per cent of the lepers in these islands.

Probably nowhere in the world has there been such an extensive and thorough experiment on the control of leprosy by segregation as that in the Philippine Islands. This experiment has been going on since 1906. The results are shown in table 4.

In the twenty years since the initiation of this segregation program, the yearly collection of new lepers has shown no progressive decrease. The results of this great experiment indicate that segregation alone will not control leprosy and that contagion alone does not explain its spread.

In connection with the rise and decline of leprosy in different regions and the claims for the effect of segregation, the statement of Valverde<sup>30</sup> concerning leprosy in the state of Bahia, Brazil, is of interest.

<sup>29</sup> Ann. de Méd. et de Pharm. Colon., 1920, 18: 109; Trop. Dis. Bull., 1921, 18: 393.

<sup>30</sup> Arch. Brasileiros de Med., 1921, 11: 702.

He says that, whereas the state of Bahia was formerly one of the principal foci of leprosy in Brazil, the disease is now so rare there that he himself, born and brought up in the state, has never seen a case in the interior and but few in the capitol—and no special precautions have been adopted by the state!

It is perhaps true, as the statistics collected by Hollmann,<sup>31</sup> Denny,<sup>26</sup> Gomez, Basa and Nicolas,<sup>32</sup> and Hasseltine,<sup>33</sup> appear to show, that children born and allowed to remain with leprous parents in leprosaria have a higher incidence of leprosy than when removed at birth from leprous surroundings. Childhood is the susceptible age, and leprosaria are super-infected localities, both from the concentration of advanced cases of leprosy and from their infecting the soil. On the other hand, adult attendants at leprosaria show little, if any, higher incidence of leprosy than other adults in the same region. The data concerning these children, if correct, would supply the only unimpeachable evidence that leprosy may sometimes be spread by contagion. At the same time it does not invalidate the soil infection theory, which admits contagion as a possible secondary mode of infection.

The history of leprosy contains repeated mention of localities, especially islands, in which leprosy was absent until the immigration of one or more lepers, when the disease is said to have spread and become endemic and even sub-epidemic. Such records are often open to question. Take, for example, the Hawaiian Islands. The history of leprosy in these islands, as generally quoted, is that leprosy did not exist there previous to 1848, when it was introduced by Chinese immigrants, following the discovery of gold in California. This history has been questioned by some leprologists, and is open to debate on several grounds: because of the absence from Hawaii in earlier years of medical men competent to diagnose leprosy; because the earliest missionaries (1820) described the natives as being almost universally covered with skin diseases and sores as unsightly as lepers, and because there are well authenticated cases of leprosy in Hawaiians as early as 1830 (Mouritz<sup>19</sup>). It is, however, quite possible that remote islands, especially those of volcanic origin, would have a soil originally free from the lepra

<sup>31</sup> U. S. Pub. Health Bull. No. 39, 1910, pp. 43-50.

<sup>32</sup> Philippine Jour. Sci., 1922, 21: 233.

<sup>33</sup> U. S. Pub. Health Bull. No. 141, 1924, pp. 55-64.



actinomyces. Immigrant cases of leprosy would sooner or later infect the soil, and the lepra actinomyces, being a soil organism, would multiply rapidly and ultimately spread throughout the island. When it had become widespread and numerous enough, it might give rise more or less simultaneously to a considerable number of cases of leprosy, thus simulating the explosive sub-epidemics described in such regions.

Contrast with these doubtful contagious sub-epidemics, said to be due to a few leper immigrants, the well substantiated history of the immigration of 170 lepers from Norway to America (the North Middle States) in the Nineteenth Century. Hansen (Gronvold<sup>34</sup>), an ardent contagionist, personally investigating the subsequent history of these immigrant lepers, was unable to discover a single new case originating in America from these 170 imported cases, none of which had been segregated. This may be considered a great natural experiment on the contagiousness of leprosy, completely controlled, since it was conducted in a region previously free from the disease. Why did not leprosy spread from these imported cases, at least among members of the leprous families? Hansen attributed the failure of contagion in these cases to the improved hygienic conditions under which the immigrants lived in America. But Bracken,<sup>35</sup> writing of the Norwegian lepers in Minnesota, says: "One cannot but feel, on entering a filthy home and seeing a leprous mother careless in her habits, that the children are not safe." Evidently some factor besides contact is necessary for the spread of leprosy. It cannot be the climate of the northern states, because these lepers came from a similar climate in Norway (leprosy has flourished also in Iceland). On the other hand, a low or negative natural soil infection, and the absence of intensive soil pollution by the imported lepers because of the wide separation of prairie homes, is a plausible explanation.

Geill<sup>36</sup> of Dutch India, Muir, Landeman, Roy and Santra<sup>37</sup> of British India and other authors in several countries have called attention to the frequency with which the first lesions of leprosy appear on the feet and legs of primitive peoples, especially those inhabiting rocky hill

<sup>34</sup> See H. M. Bracken: *Lepra Bibliotheca Internat.*, 1900, 1: 37.

<sup>35</sup> *Lepra Bibliotheca Internat.*, 1900, 1:37.

<sup>36</sup> *Lepra-Confr. z. Berlin*, 1897.

<sup>37</sup> *Indian Jour. Med. Res.*, 1923, 11: 543.

countries. This would suggest dirt-infected wounds of the lower extremities as the origin of the disease. In fact, Geill suggests that infection of such cases comes from the soil, which is inoculated from lepers, and that the soil serves as an intermediary in the transmission of leprosy from man to man. As an outstanding example of probable soil-contaminated wound infection, in which the history is clean cut, the following case of leprosy is interesting: J. N., male Chinese-Hawaiian, was received at the Kalihi Hospital August 30, 1927, as a suspected leper. This patient gave a history of injury to the right ear, caused by being thrown against a barbed wire fence by an unmanageable team of horses while engaged in the cultivation of a field. The patient states that the ear was slow in healing, and several months later became, and has remained, swollen. When he presented himself for examination the ear was tense, not nodular, but over several small areas there were encrustations. A snip of the ear disclosed much edema, and microscopic examination of the exuding fluid disclosed large numbers of Hansen's bacterium. At the time of this primary examination the symptoms and lesions were restricted to the wounded ear, although such lesions are usually bilateral. An extension of the lesions, which occurred subsequently, was first to the face and neck but later became generalized.

Sporadic cases of leprosy, which appear from time to time in regions where leprosy is not endemic, and in persons who have not visited endemic countries or had known contact with lepers, present evidence contradictory to the theory of contagion as the exclusive mode of infection. These cases are ignored by the contagionists, or it is assumed that these patients have had some unrecognized contact with a leper. Such unrecognized contact must have been most casual, contrary to the belief that contact must be intimate and prolonged to convey the infection.

The incidence of leprosy is everywhere about twice as high among males as among females. Concerning this peculiar fact, Brinckerhoff<sup>38</sup> commented: "The preponderance of males among lepers, unless due to sex susceptibility, would indicate that the disease is acquired without rather than within the home circle. This deduction is not in

<sup>38</sup> U. S. Pub. Health Bull. No. 33, 1910.

accord with the current theories as to the mode of transmission of leprosy." It is, however, completely in accord with the theory of soil infection, since in general the male throughout life at play and at work is more exposed to the soil and soil-infected wounds than is the female.

Leprosy is a disease of rural communities rather than of the congested population in cities. Brinckerhoff,<sup>39</sup> in a discussion of the status of leprosy in Hawaii in 1908, gives the yearly average of cases of leprosy coming from the several districts of the island of Oahu. He remarks on the greater proportion of cases coming from the Kona district, which includes the city of Honolulu. When, however, the incidence of leprosy from the several districts is reduced to percentages of population the significance of his figures is quite different. While the new cases of leprosy coming from the city of Honolulu and the surrounding thickly populated area, which contained 81.2 per cent of the population of the island, amounted to about 3.5 per 1000, in the remaining sparsely populated parts of the island the incidence was 8.5 per 1000. Likewise, the reports on leprosy in Malta by a government committee<sup>40</sup> state that the disease was met with almost entirely among the rural population and that agricultural laborers were mostly affected. Again, Yoannovitch,<sup>41</sup> writing of leprosy in Bosnia and Herzegovina, says that all cases are among peasants and none in the towns. And Muir,<sup>42</sup> discussing some factors which influence the incidence of leprosy in India, writes: "Most town leprosy is imported, and strongholds of the disease in the country must be delivered and dealt with if its prevalence is to be reduced." This prevalence of leprosy in rural communities and among agricultural workers, and its low incidence in congested centers of population, which the quotations have shown to be world-wide, is incompatible with contagious dissemination of the disease, but would be an inevitable consequence of soil infection.

<sup>39</sup> U. S. Public Health Bull. No. 33, p. 6.

<sup>40</sup> Ref., Trop. Dis. Bull., 1919, 14: 185.

<sup>41</sup> Bull. Office internat. d'Hyg. Pub., 1926, 18: 1404; Trop. Dis. Bull., 1927, 24: 548.

<sup>42</sup> Indian Jour. Med. Res., 1927, 15: 1.



## SUMMARY AND CONCLUSIONS

The confusion and doubt surrounding cultivation of the lepra bacterium are due largely to the pleomorphic and facultative acid-fast characters of this organism.

The acid-sensitive or partly acid-fast coccoid, diphtheroid, and actinomyoid organisms, that have been cultivated repeatedly from leprosy, are different stages in the life cycle of the same organism.

Hansen's bacterium in leprosy lesions is probably the tissue stage of this pleomorphic and facultative acid-fast lepra organism.

This organism cultivable from leprosy belongs in the genus *Actinomyces*, as now constituted, and is most nearly related to the facultative acid-fast species, such as *Actinomyces asteroides* and *A. caprae*.

The difficulty of cultivation of the lepra bacterium, the failure of experimental infections of man with leprosy material, and many of the clinical and pathological peculiarities of the disease appear to be due, in part at least, to the fact that the majority of the lepra organisms in the tissues of lepers are dead.

Actual proof of the identity of the actinomyces cultivable from leprosy with Hansen's bacterium in the tissues, like proof of the etiologic relation of Hansen's bacterium to leprosy, would depend upon the experimental reproduction of the disease in animals. Notwithstanding the absence of such proof, the evidence in support of both relations is convincing.

The actinomyces of leprosy, like other pathogenic actinomyces, is a soil organism probably of wide but irregular distribution, and is only a facultative parasite.

Leprosy probably is primarily an infection from the soil, presumably through wounds; but contagion as a possible secondary mode of dissemination is not thereby excluded.

The bearing of these conclusions on methods of control of leprosy is obvious. It may ultimately be found that protection from soil-infected wounds, and proper cleansing and disinfection of contracted wounds, are at least as important as the segregation and isolation of lepers.



## THE IDENTITY OF HUMAN LEPROSY AND RAT LEPROSY

ERNEST LINWOOD WALKER AND MARION A. SWEENEY

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco, California*

Received for publication April 15, 1929

In a recent paper one of us<sup>1</sup> has demonstrated by transmutation experiments that the various types of acid-sensitive and acid-fast bacteria—cocci, streptococci, diphtheroid, rod and branching filament—that have been repeatedly cultivated by bacteriologists from leprosy lesions of man are different stages in the life cycle of one pleomorphic and facultative acid-fast organism; and evidence was submitted that Hansen's lepra bacterium is the tissue stage of this cultural organism. It was further shown that this pleomorphic and facultative acid-fast organism belongs in the genus *Actinomyces* as now constituted, and that this actinomyces like other species of the genus is a soil organism. And it was concluded that human leprosy is primarily a soil infection with this facultative parasite, probably through contaminated wounds in the skin. Following these discoveries and conclusions, our attention has been directed to a study of the similar disease in the rat, with the expectation that it might throw further light on the human disease.

In 1903 Stefansky<sup>2</sup> first described a disease of the brown or sewer rat (*Epimys norvegicus*) at Odessa that closely resembled human leprosy, and in the lesions of which occurred enormous numbers of acid-fast bacteria indistinguishable from Hansen's lepra bacterium of man. Following Stefansky's discovery other investigators have found the same leprosy-like disease of rats in Germany, France, England, India, New Caledonia, Australia, Japan, Brazil, French Guiana and the United States; so that it would appear that rat leprosy is a disease of more or less general distribution throughout the world.

<sup>1</sup> Jour. Prev. Med., 1929, 3: 167.

<sup>2</sup> Centralbl. f. Bakt., I, Orig., 1903, 33: 481.



Stefansky distinguished two types of the disease: a purely glandular form, limited to the subcutaneous glands; and what he designated as a skin-muscular form, which involves the skin and subcutaneous tissues as well as the glands. The purely glandular type was said to be by far the more prevalent. Stefansky calls attention to the close similarity to the lesions of human leprosy, of the lesions in the glands and skin of the rat, in gross, histological and bacteriological detail.

McCoy<sup>3</sup> gives a statistical and pathological description of the disease as it occurred among rats in San Francisco. It was found in a form recognizable to the naked eye in only 186 of 200,000 rats examined (an average of 1 in 1074 rats). A diffuse subcutaneous infiltration was the most constant pathological finding, being noted in 182 of the 186 cases. This lesion consists of a yellowish white granular layer that is readily mistaken for fat, and varies from a small indefinite fleck to a thick layer covering practically the whole body. Associated with this subcutaneous infiltration, alopecia of varying extent occurred in 47.5 per cent of the cases and ulcers of the skin in 22 per cent. The lymphatics were usually involved, even when showing no gross lesions, as disclosed by microscopic observation. Lesions of the internal organs were rare.

Henderson<sup>4</sup> has made a histo-pathological study of the developing cutaneous lesions of experimentally induced rat leprosy, and compares it with the conditions found in naturally acquired human leprosy. He finds that rat leprosy bacteria when inoculated subcutaneously spread for some distance radially along the lymphatic planes between the corium and the subcutaneous tissue before invading either the overlying or underlying tissues. With the exception of the lymphocytic proliferation there is practically no reaction in the neighborhood of the lesions; associated with the absence of reaction there is an absence of giant cells. However, once the lymphocytic barrier is broken down, the disease process extends superficially and deeply. The necrosis that develops in the center of the lepromata is brought about entirely by mechanical means, by the extensive accumulation of bacteria-laden cells. Reaction and giant cells found in certain

<sup>3</sup> U. S. Pub. Health Bull. No. 61, 1913, p. 27.

<sup>4</sup> Indian Jour. Med. Res., 1928, 16: 1.

types of human leprosy are believed by Henderson, on the basis of his clinical and histological studies, to occur in those cases in which there is a maximum effort on the part of the tissues to restrict the spread of the disease. On the other hand, the microscopic picture in rat leprosy suggests that the disease though chronic is essentially progressive and that there is no attempt at self healing. Both human and rat lepra cells show a similarity in morphology and in their relation to the microorganisms causing the diseases. In the rat Henderson identifies the lepra cell as belonging to the macrophage or histocyte system as does the human lepra cell.

Rat leprosy can be transmitted from rat to rat by the inoculation of material from the leprosy lesions. In this respect it seems to differ from the human disease in which transfer by inoculation has apparently failed. On the other hand, the attempts to cultivate the acid-fast organism from rat leprosy have given the same incongruous results as in human leprosy. Most of these attempts have been reported as unsuccessful. Dean<sup>5</sup> failed to cultivate an acid-fast organism, but did obtain in cultures from two infected rats an acid-sensitive diphtheroid similar to that frequently cultivated from human leprosy. Hollmann,<sup>6</sup> Chapin<sup>7</sup> and Bayon<sup>8</sup> each succeeded once in cultivating an acid-fast bacterium from a leper rat. Currie and Hollmann,<sup>9</sup> in the course of numerous cultivation experiments, found in one instance an acid-fast "streptothrix" from a skin ulcer in rat leprosy, which they considered a contaminant. And Uchida<sup>10</sup> claims to have cultivated 4 strains of acid-fast bacteria from lepra rats in Japan, none of which produced leprosy when inoculated into rats. None of these cultivated organisms has been accepted as the bacterium of rat leprosy.

Nearly all authors have remarked on the similarity of rat leprosy to the human disease in clinical, bacteriological, pathological and endemiological characters. Nevertheless, their exact relationship

<sup>5</sup> Centralbl. f. Bakt., I, Orig., 1903, 34: 222.

<sup>6</sup> Pub. Health Rpts., 1912, 27, I: 69.

<sup>7</sup> Pub. Health Rep., 1912, 27, I: 161.

<sup>8</sup> Trans. Soc. Trop. Med., 1912, 5: 158.

<sup>9</sup> Pub. Health Bull. No. 50, 1912, p. 11.

<sup>10</sup> Japan Med. World, 1922, 2:4; Trop. Dis. Bull., 1922, 19: 594.

remains in doubt. Mezincescu<sup>11</sup> and Schmitt<sup>12</sup> have employed complement deviation for investigating this relation, using the sera of human lepers in different stages and types of the disease and the acid-fast organisms from the lesions of rat leprosy. More or less complete fixation of the complement was obtained in almost every case. Both authors are, however, somewhat conservative in their conclusions. Mezincescu considers that the two diseases should be classed, from the point of view of immunity, in the same group. And Schmitt says that "there is a definite relation, not alone from the appearance of the lesions and the bacterial findings between rat and human leprosy, but also from the results obtained with complement fixation." Marchoux<sup>13</sup> in 1923 described an atypical case of human leprosy which he was able to transmit to rats by inoculation, and which he suggests might be an infection of man with rat leprosy. Altogether the generally accepted opinion appears to be that rat and human leproses are closely related, but nevertheless distinct.

In 1920, during some microscopic and cultural studies of the organs of wild rats (*Epimys norvegicus*), we found that 15 of 19 adult rats (78 per cent) caught in the market district of San Francisco, although giving no gross evidence of leprosy, showed acid-fast bacteria in the subcutaneous tissues, glands or spleen; 16 of 56 rats (28 per cent) caught in the Hooper Foundation buildings showed the same findings. Thus 41 per cent of 75 rats examined were found to be harboring acid-fast bacteria in their tissues. Since these microscopic examinations were restricted to a few smears from one or two localities and the acid-fast organisms are usually scarce and localized in small clumps, it is evident that these findings underestimate the true extent of the occurrence of acid-fast bacteria in the organs of wild rats. From the tissues of some of these rats there were cultivated pleomorphic and facultative acid-fast organisms resembling those found by many workers in human leprosy.

Following the investigation on human leprosy by one of us,<sup>1</sup> we have returned to the study of rat leprosy, devoting our attention especially to cultivation experiments. The material was obtained

<sup>11</sup> Compt. rend. Soc. de biol., 1909, 66: 56.

<sup>12</sup> Univ. Calif. Pub. Path., 1911, 2: 29.

<sup>13</sup> Ann. de l'Inst. Pasteur, 1923, 37: 342.



chiefly from the laboratory of the United States Public Health Service at San Francisco, where trapped rats are necropsied for plague control.<sup>14</sup>

The spleen and sometimes the testes of the rats were most frequently used for cultural material, since these organs have been frequently found infected, are less liable to extraneous contamination and present relatively large masses of tissue for surface disinfection. At times, however, the lungs, glands and subcutaneous tissue were used. In rats showing clinical leprosy, material was taken from the subcutaneous lesions, as well as from the glands and organs; and in the rats inoculated with rat leprosy, blood from the heart of the freshly killed animal was also examined. The material was removed from the necropsied rats as aseptically as possible and the tissues or organs placed in sterile Petri dishes. At the laboratory the spleens and other organs or tissues of sufficient size received surface sterilization by being dipped into smoking-hot paraffin and transferred to fresh sterile Petri dishes. The tissue was then minced to a fine pulp with sterile scissors and portions of it transferred to culture tubes. Musgrave and Clegg's agar medium was used for these cultivation experiments, because the leprosy organism usually is acid-fast on it, even in the presence of contaminations, and consequently is readily differentiated from other bacteria. The cultures were then incubated at 22° to 25°C.

In the preliminary work here reported an acid-fast organism has been cultivated, on Musgrave and Clegg's medium, 64 times from the spleen, testis, glands, lungs or subcutaneous tissue of 24 out of 37 (65 per cent) wild rats showing no gross lesions of leprosy. This percentage of infection among apparently normal rats is probably too low, for the reasons given above, and for the additional reason that the organism does not always grow acid-fast on the culture medium. A similar acid-fast organism has been grown in 17 cultures from the subcutaneous lesions, glands, spleen or kidney of 3 rats (100 per cent) exhibiting well marked lesions of rat leprosy. The same organism has also been cultivated from the lungs, axillary glands and heart blood of 3 white rats (100 per cent) inoculated with material from the lesions of a wild leper rat 7 days, 84 days, and 7 months respectively

<sup>14</sup> We are indebted to Surgeon J. C. Perry in charge of this district and to his assistants at the Federal Laboratory for the privilege of obtaining this material.

before culturing. The last of these 3 experimental rats showed well marked subcutaneous lesions of rat leprosy.

This cultural organism is usually coccoid and more or less acid-fast in its growth on Musgrave and Clegg's medium; but on other media it may assume streptococcoid, diphtheroid, rod or branching filament forms and be either acid-sensitive or acid-fast. In these striking morphological and tinctorial transmutations this organism cultivated from the rat corresponds with the organism cultivable from human leprosy, which one of us has identified as an actinomyces of soil origin. And a comparative study of the cultures from the rat, human leprosy and the soil has demonstrated conclusively that the strains from all three sources are identical. We are consequently convinced that rat leprosy has the same etiology and endemiology as human leprosy; that it is an actinomyces infection from the soil.

We have been particularly impressed with the prevalence and significance of the latent infections with this actinomyces in the rat. These latent glandular infections in rats have been noted by Stefansky and other investigators. We have found them by direct microscopic examination in 41 per cent, and by culture in at least 65 per cent, of adult brown rats in San Francisco; while McCoy<sup>3</sup> found only about 0.1 per cent showing clinical leprosy in this city, and Uchida<sup>15</sup> found an incidence of only 0.007 per cent of clinical rat leprosy in Tokyo. Thus it would appear that the great majority of the infections of rats with the lepra actinomyces remain latent in the glands, spleen or other organs, where they continue alive and probably proliferate slowly but not sufficiently to produce gross lesions. It is only exceptionally that the infection succeeds in adapting itself to growth in the cutaneous tissues, where the infecting organism is able to multiply more rapidly, causing the characteristic lesions of rat leprosy. This adaptation to growth in the cutaneous tissues once acquired is retained both for the progressive spread of the lesions in the diseased rat and for transplants into other rats. This would account for the high percentage of active infections obtained by experimental inoculation of material from cutaneous lesions of rat leprosy, as compared with the small percentage of active leprosy among rats naturally infected from the soil.

<sup>15</sup> Tokyo Iji Shinshi, 1921, No. 2252; Trop. Dis. Bull., 1922, 19: 594.

The recognition of this common etiology and epidemiology of rat leprosy and human leprosy promises to throw a flood of light on the many baffling problems of the human disease. The great prevalence of latent infections with the *lepra actinomyces* among rats suggests the probable existence of a similar condition in man. Indeed, there is considerable evidence, some of which is fairly conclusive, in support of this probability. Auché,<sup>16</sup> Falcao,<sup>17</sup> Kitasato,<sup>18</sup> Sorrel,<sup>19</sup> Leboeuf,<sup>20</sup> Serra<sup>21</sup> and others have found *lepra* bacteria in the lymphatic glands and other tissues of a considerable proportion of healthy persons in contact with lepers. Contacts only were examined on account of the current theory of the spread of leprosy by contagion. It would be interesting to have similar examinations made on persons in non-endemic regions. There are grounds for suspecting that the diphtheroids cultivated by a number of investigators from the lymphatic glands in Hodgkin's and other diseases and even in health are the diphtheroid acid-sensitive stage of the *lepra* organism in such latent infections. Leboeuf reëxamined in 1912 five of seven persons in whose skin Auché had found Hansen's bacteria in 1897; Leboeuf found that two had become evident lepers while the other three showed no signs of the disease after the 15 years' interval. Serra found acid-fast bacteria in the glands of twelve persons living in contact with lepers but free from all symptoms of the disease. Keeping these persons under observation, Serra was able to observe the appearance of definite symptoms of the disease in some of them, in one case as late as 7 years after the first examination. He concludes from these observations that there is an analogy between leprosy of man and the rat, in that the specific organisms may be present for a long time—perhaps for life—in the glands without setting up a general infection. Conversely, Pineda,<sup>22</sup> at the Culion leper colony, Philippine Islands, found Hansen's bacteria in the glands and internal organs of persons apparently cured of leprosy. In material aspirated

<sup>16</sup> Quoted by Leboeuf.<sup>20</sup>

<sup>17</sup> XV Cong. internat. d. méd., Lisbon, 1906.

<sup>18</sup> Conférence internat. d. lepra, Bergen, 1909.

<sup>19</sup> Bull. Soc. de path. exot., 1912, 5: 698.

<sup>20</sup> Bull. Soc. de path. exot., 1912, 5: 463.

<sup>21</sup> Gior. Ital. d. Dermat. e Sifil., 1926, 67: 1109.

<sup>22</sup> Jour. Philippine Islands Med. Assoc., 1927, 7: 109.



from the femoral glands the organisms were observed in 9 out of 53 leprosy patients under treatment who, judged by clinical evidence and bacteriological examination of skin snips, had been negative for two years. And at 11 autopsies, done from 5 to 17 months after the patients had become clinically and bacteriologically negative, 10 of the bodies were found harboring acid-fast bacteria: 7 times in the ulnar nerve, 5 times in the lymph nodes, once each in the liver and spleen, 3 times in the testis (8 males) and once each in the tonsils and prostate in 3 and 2 examinations respectively.

The occurrence of such latent infections in both rat and man indicates that there exists a more or less balanced relation between parasite and host, and that the development of active leprosy in either host depends upon some disturbance of this balance. This condition in leprosy appears to be entirely analogous to that of infections in man with *Entamoeba histolytica*, in which latent infections are common and widespread, but acute entamoebic dysentery only occasional, and least prevalent in civilized communities of temperate climate.

The recognition of the prevalence of these latent glandular infections with the lepra actinomycetes and the balanced relation existing between parasite and host make clear many obscure aspects of human leprosy. It explains why, with a general soil infection with the lepra actinomycetes, we may have so few cases of clinical leprosy. It accounts for the gradual spontaneous decline of leprosy in all civilized communities under improved economic and hygienic conditions. At the same time it anticipates the appearance of sporadic cases of the disease such as occur from time to time in non-endemic regions. It explains the varied and often greatly prolonged incubation period of leprosy. It helps us to understand the mechanism of the intermittent progress of the disease with its alternation of quiescent phases and acute exacerbation, the relapse of treated and apparently cured cases and the absence of lesions in the internal organs of lepers. And it explains in part the apparent failures of inoculation of leprosy into man and other animals.

These lights on some of the obscure phases of leprosy represent only the beginning of a new progress in leprosy research that should be initiated by the recognition of the identity of the disease in rat and

man. Of especial importance for this advance is the fact that the discovery of this identity of the two leprosy diseases provides an experimental animal for the study of the human disease, of which the lack has hitherto constituted an insurmountable barrier to experimental investigation.





Reprint from California and Western Medicine,  
April, 1929. Volume XXX, No. 4  
593 Market Street, San Francisco

## MALARIA—A PRACTICAL REVIEW\*

By ALFRED C. REED, M. D.  
San Francisco

DISCUSSION by Walter V. Brem, M. D., Los Angeles;  
Harry A. Wyckoff, M. D., San Francisco.

PROBABLY no disease in the world today equals malaria in its menace to human life and progress in general. Its exceedingly wide distribution, its tremendous production of invalidism, its antecedent relation to secondary diseases, in addition to its direct mortality, make it perhaps a major disease enemy of man. Moreover, its main is primarily in those parts of the earth where the white man's future is concerned, because in the tropical areas lies the future food of his race and the probable site of his greatest commercial activity. There the development of power will certainly lead to a new type of industrial life, with the consequent needs of a white population living under tropical conditions, and also the need of improving the efficiency and standards of native races. Malaria is the greatest single obstacle. The same is true in the history of ages, as witness Greece and Rome and many other ancient régime.

### MALARIA IN CALIFORNIA

But we are not outside the danger zone in California. Our interest in combating this disease is not solely academic. The Pacific countries which

---

\*From Pacific Institute of Tropical Medicine, in the Cooper Foundation of the University of California.

we must serve medically, and from whom patients are coming to us in increasing numbers, have in California a fellow sufferer from this greatest of tropical plagues. Its decrease in the San Joaquin Valley has followed good sanitation and scientific control methods. But it is still present there. In the northern valleys of the Sacramento it is still prevalent and a serious personal and public health problem. This is especially true in the deep mountain valleys. Thus from several points of view the physician in California is intimately concerned with malaria, first and chiefly of course, with its eradication in our own state, and then vitally also, with its control in those countries to which we are being constantly tied closer and with which our future is so closely associated, in the great Pacific Basin.

#### TYPES OF MALARIA

For the clinician, malaria exists in three forms. It is caused by a protozoan parasite of the red blood cells which is transmitted from man to man solely by certain species of anopheline mosquitos. In the mosquito it undergoes a definite cycle of sexual development. In man it undergoes an asexual cycle with the production of sexual forms which are not infective for man and which only develop when ingested by the proper mosquito. Thus we have two general points of approach to the problem of control. We can either destroy the mosquito and thus effectually limit the spread of malaria, or we can destroy the sexual forms of the parasite and thus prevent the infection of mosquitoes. We will consider these two later on.

Three forms of parasite are concerned. Their differentiation is important from the standpoint of treatment, prognosis, and prevention of spread. The disease produced by the ordinary benign malar-

an, or better, tertian parasite, with its characteristic chill, hot stage, and sweating, may at first show an irregular febrile course for a few days only. Then it assumes the typical third day paroxysm form, which is clean-cut, sharply limited and perhaps more apt to appear in the mornings. A double tertian infection is not uncommon, but each generation is inclined to maintain a separate fever height.

Quartan malaria is much the least common of the three, and its distribution shows a peculiar and unexplained patchy quality. It occurs often in sharply limited areas and often shows a seasonal incidence which also is unexplained. In tropical areas, where it is found, the poorer class of the population is more susceptible. Like benign tertian, if there is a double infection, the generations are separated in their maturation by exactly twenty-four hours. It is difficult of cure and prone to relapses even after several years. The toxin seems to damage the nervous system especially, and nervous effects are always more severe in patients having already some form of nervous disturbance. The parasites are usually few in number in the blood, but they give rise to a severe symptomatology.

Subtertian malaria was sometimes wrongly called estivo-autumnal fever. The best of the many terms used is simply subtertian. It is the serious malaria of the tropics and much inclined to show pernicious or malignant features. The fever is remittent, and while there is no such characteristic paroxysmal periodicity as in the benign malarias, still some periodicity in temperature or some other symptom can often be traced. Profuse vomiting and the so-called dumb ague are common. It particularly affects the mental capacity, and it is distinctly unsafe to try to "fight



the fever" with this infection. The patient does much better to give up at once, go to bed and submit himself to careful treatment without any delay whatever. The parasites do not develop in clear-cut generations as in the other forms, but there is a constant maturation of parasites resulting in a more or less constant toxemia. For this reason parasites at different stages of development are seen in the blood at one time.

In subtertian malaria, pernicious symptoms may develop at any time and with no warning. The appearance of developing forms of the parasite in the peripheral blood is a danger signal of importance, meaning that the capillaries of certain viscera are overcrowded and cannot hold all the growing forms which thus overflow into the circulating blood. Under such conditions the patient must be saturated with quinin in some form within six hours to prevent death.

It is not generally realized that subtertian malaria can simulate almost every other known disease, and can produce symptoms localized in any part of the body whatsoever. The reason for this is easy to understand when we recall one peculiarity of the parasite. The youngest forms, inoculated by the mosquito, grow for a short time only in the circulating blood. As soon as they have passed the small ring stage of growth they become adhesive and adhere to the capillary lining in the deep viscera, especially the liver and spleen. Less commonly they concentrate in some other organ, as the brain or lung or intestine. The symptomatology, therefore, is as varied as the points of localization of the parasites in the organs of the body. This concentration of sticky parasites in the visceral capillaries does not cause thrombosis but direct blocking of the blood channels and pro-

ly precipitates a major toxic action in the adjacent structures, when the full-grown organisms capture and release their specific toxin.

The cerebral forms are especially dangerous, and in children are apt to be associated with convulsions which are extremely dangerous. In a malarious district, blood examination for malaria is a safe procedure when patients are seen suffering from convulsions with fever, because, if due to untreated malaria, death is common within eighteen hours. In adults, confusion is easy with late alcoholism. Again in a tropical or malarial area, blood examination and temperature record are safe procedures in cases suspected of alcoholism. In fact many of these will have taken alcohol to some degree, and the odor of it on the breath may be misleading. Coma is another common and dangerous manifestation. A patient may recover after going into coma twice. Malaria should be kept in mind in connection with mania, diabetes, alcohol, and opiates in the differential diagnosis of coma. Libraries are filled with descriptions of the various forms and features of malaria. It is enough in this review to call attention to the literally protean manifestations of subtertian malaria and to urge blood examination and conscious exclusion of malaria in all tropical cases with fever and in all doubtful cases where there is possibility of malaria being present.

#### CHRONIC MALARIA AND MALARIAL CACHEXIA

Chronic malaria and malarial cachexia are serious after-effects usually following improper treatment. Blackwater fever is somewhat endemic in distribution and, if encountered, positively should be treated with quinin. It is known to be associated with subtertian malaria, but quinin is

apt seriously to increase the hemoglobinuria. About half the cases which recover are cured of their malaria by the attack of blackwater. Therefore quinin had better be postponed for later use if malarial organisms are found in the blood after the acute blackwater fever is past. Paroxysmal hemoglobinuria can be excluded by the autolysis blood test, and a history of onset from chillings of some part of the body usually in repeated attacks which are seldom clinically serious.

Aside from its actual death rate, malaria predisposes to all other contiguous diseases by lowering resistance, and produces a huge amount of direct invalidism extending from the acute attack through a more or less prolonged convalescence. As has been stated, it is undoubtedly the greatest single disease problem in the world today. Its recognition and efficient treatment by the individual physician are matters, therefore, of the utmost importance.

#### DIAGNOSIS

Diagnosis rests on the following points:

1. *Demonstration of the Parasite.*—For practical purposes one must remember that the following forms of parasite may be seen in ordinary blood films that have been stained with Leishman or Romanowsky stain: the young ring forms; the growing ameboid or trophozoite form; the matured stage ready to rupture the blood cell, called the merocyte; and finally the sexual forms or gametocytes. For the exact recognition of malaria, these must be recognized and distinguished. A single parasite may not tell the story but the slide should be searched and careful note made of the various forms seen. The subtertian *Plasmodium falciparum*, as has been stated, shows



ly the young rings and the sexual forms or metocytes. The rings are small, clear-cut, easily seen, often several in one red cell, and often in colé or appliqué forms as if clinging to the outside and projecting beyond the red cell. The presence in the same slide of these rings, associated with the large crescents or sexual forms, is diagnostic. In benign tertian, *Plasmodium vivax*, the infected red cells are always definitely enlarged and the rings are usually single in each cell. The cell is paler and soon shows a fine stippling with black dots called Schüffner's dots. And all parasites are at the same stage of development. In quartan, *Plasmodium malariae*, the rings are the smallest of the three, up to a third the diameter of the red cell, which is not changed in size, and the rings in a few hours become coarse with very coarse granules. Only one stage of the parasite is seen in one slide.

In the growing or trophozoite stage, it is easy to remember that the *Plasmodium falciparum* of tertian never appears under ordinary circumstances. We have then to differentiate only the benign forms. Tertian trophozoites are always in enlarged pale red cells with Schüffner's dots present, while *Plasmodium malariae* of quartan shows no enlargement of red cells, no dots and the abundant presence of the so-called band forms which are easily recognized and are diagnostic. Again in the mature stage or merocyte, tertian forms do not appear in the peripheral field. Again benign tertian parasites are in enlarged pale red cells with abundant Schüffner's dots, with the chromatin divided into some sixteen segments which are not in a regular arrangement, and pigment is collected in the center. Quartan merocytes have no dots, are in unenlarged red cells and have a more typical rosette appearance

with eight masses of chromatin. On rupture of the red cell these masses of chromatin, called merozoites, are the bodies that invade new cells and repeat this asexual cycle of schizogony. After a time it is found that all the parasites are not of the merocyte or trophozoite form, but some appear as the sexual or gametocyte forms. These are hardly distinguishable for the ordinary observer in benign tertian and quartan malaria. They are larger bodies which can be best recognized by reference to textbook illustrations. The association with the characteristic earlier forms of the parasite will decide whether they are *P. vivax* of benign tertian, or *P. malariae* of quartan. The gametocytes of *P. falciparum* or subtertian malaria appear again in the peripheral blood, where they are found in association with the young merocyte forms of the same parasite.

In case ring forms of doubtful nature are found alone, reëxamination after a few hours will show whether they have all advanced to a further stage of development, as in benign tertian and quartan malaria, or whether they have remained the same, as in subtertian, in which case crescents will usually be found by added search.

2. *Clinical Phenomena*.—In the second place diagnosis rests on certain clinical phenomena, of which fever with periodicity takes first place. An enlarged spleen, and therapeutic response to quinine are also important.

3. *Blood Examination*.—In the third place a blood examination may show an increased percentage of large mononuclears, together with moderate leukopenia, and melaniferous leukocytes.

#### COMMENTS ON PATHOLOGY

Two points in the pathology of malaria are important in this review. First, the growing form

f the parasites themselves are agglomerated  
ensely in the subtertian form in the capillaries  
f various viscera or in any part of the body.  
econd, pigment is produced by all the malarial  
parasites and carried by phagocytes to various tis-  
ues. The pigment is derived from the hemo-  
lobin of the red cells by the digesting action of  
e parasite and collects in the parasite because  
has no means of excretion. When the contain-  
g red cell ruptures, the pigment is dropped free  
d is then taken up by phagocytes of the white  
ells, and vascular endothelium, and especially by  
e large mononuclears. Presence, therefore, of  
gment in these cells, in the absence of finding  
parasites in the red cells, is important and indi-  
tes active malaria. It is deposited chiefly in the  
er and spleen. In the liver it appears as black  
regular masses of melanin, with iron in fast  
mbination. In the spleen it is seen chiefly in  
e large macrophages of the pulp and in the  
othelium of the vessels. The slaty dark color  
the spleen does not clear up on exposure to  
ygen as in the case of ordinary congestion of  
e organ. The spleen seems to be the last resort  
habitat of the pigment and releases the pigment  
th difficulty. A third point might be added  
der functional pathology, calling attention to  
e intense toxemia of malaria, the toxin being  
ed in the circulation on the rupture of the para-  
zed red cells.

## TREATMENT

Treatment is, after all, rather simple and can  
discussed briefly under definite headings:

.. *Drug Treatment.*—Drug treatment is di-  
ided into three portions. The first two are alter-  
ative. The third is secondary to both.



(a) *Quinin*.—As a general rule for an average adult give 2.0 grams (30 grains) daily for seven days, in three doses each day, in fresh gelatin capsule or simple tablet triturate, uncovered with sugar or other coating. Use preferably quinidine hydrochlorid, the most soluble salt. If expense is a serious item use bisulphate or even the sulphate. Then reduce the dose daily to a total of 1.3 grams (20 grains) given in two equal doses as before and continued for seven days. Then reduce the total daily dose to 1.0 gram (15 grains) in three equal daily doses as before for seven to fourteen days. Then reduce the daily total dose to 0.6 gram (10 grains) in two equal daily doses, and continue to a total of twelve weeks from the time treatment began. This persistence is of the utmost importance, and prevention of relapses will rest largely on this point. Certain points are to be specially noted. Swallowing the drug does not connote absorption. Only absorbed drug acts. Therefore be sure that the patient is really absorbing the full quota daily. In case of vomiting of any intractable nature, coma or any other complication interfering with mouth administration give the bihydrochlorid intravenously. Never give quinin under the skin or into the muscle. The dose by vein should be 0.3 to 0.5 grams, dissolved in sterile distilled water or saline in a 10 cc. syringe. It must be injected slowly and with particular care to avoid extravasation into the tissue outside the vessel. Three doses can be given two or three hours apart.

(b) *Plasmochin*.—After enormously extensive experiments the Bayer Company elaborated a product called plasmochin which is ethyl-aminodiquinolin hydrochlorid. The toxic dose of this product was too near the therapeutic dose to give

safe margin in treatment. Symptoms were apt to result from the drug, associated especially with anaemia due to formation of methemoglobin. Addition of a small amount of quinin has been found to obviate this toxicity. Plasmochin compound is now available consisting in each tablet 0.005 plasmochin and 0.0625 quinin sulphate. Twelve tablets are given each day for five days, then omit treatment for five days. Then give again twelve tablets each day for seven days, and then omit for five days. This procedure is followed for a total elapsed time of ten and a half weeks. The drug is well tolerated by children in proportional dosage. It is particularly effective against gametocytes, just where quinin is least effective. In heavy subtertian infections it is well added ten grains daily of quinin to the above dosage because the effectiveness is poorest against growing or trophozoite stages. In its destruction of the sexual forms, plasmochin is superior to quinin and thereby meets a need that quinin did not fill. In the compound form with quinin it is less toxic, and toxic symptoms are rare. It has little taste, which is another advantage. Patients who are very ill should always be kept in bed until the fever is controlled. This also makes the drug less effective in its action and more effective. Glucose, administered one or more daily, seems to help materially in controlling the malaria and promoting recovery. Unpleasant results may consist of indigestion, headache or abdominal pain, but these are seldom severe. The swollen spleen is quickly reduced in size and during the reduction there may be pain. Plasmochin greatly decreases relapses and seems to be a definite advance in malaria therapy. As a prophylactic, two tablets per day of the plasmochin compound are sufficient.

(c) *Symptomatic Therapy*.—Following one the other of the above courses of treatment patient should be treated symptomatically and according to the blood count, with preparations iron, arsenic, and strychnin. It is a matter of utmost importance that the specific treatment be continued vigorously the full length of time indicated.

### PROPHYLAXIS

The prevention of malaria has so far been attempted chiefly by the method of mosquito control. It has not been successful in eradicating malaria as a world problem in spite of the huge amounts of money and effort put into it. It is costly, slow, ineffective, and requires constant maintenance after being once established locally. A geographical survey of the tropical world shows at once its difficulties and the small impression on the total problem so far accomplished by it. Local, economic, religious, and social ideas are often insurmountable in the fight against mosquitoes. After many years malaria is still a major tropical disease and one of the greatest of the world's disease problems. Mosquito control should be followed, of course, as a local measure in the warfare, especially at the present, and until better weapons are available. Drainage, destruction of larvae, and mosquito-proofing are valuable procedures, where used. The larger problem of the eradication of malaria as a foe of humankind lies beyond the horizon, however, by this method.

If plasmochin compound or an analogous drug proves as effective on wholesale use as it does now on a smaller scale, we may well have in it the means for a really effective attack on the existence of malaria. Destroying the sexual forms which alone are infective for the mosquito,

le and safe procedure on this basis. Eradicat-  
the human reservoir of malaria offers a real  
e of wiping out this ancient enemy of man-  
. Measures looking in this direction require  
ation and study even while we secure what  
ection we can by present methods of mosquito  
uction. Disturbing biological balances is al-  
s a dangerous procedure and usually brings  
pected and often serious results. Destruction  
mosquitoes, if it could really be accomplished,  
d introduce this problem. Destruction of the  
rial plasmodium, parasitic in man only, would  
rb no biologic balance. To such an end we  
look, and research toward its accomplish-  
is most timely.

Post Street.

#### DISCUSSION

ALTER V. BREM, M. D. (523 West Sixth Street, Los  
es).—The author has covered the subject so  
thensively that there is but little to add. I  
like, however, to say a few words regarding  
fferential diagnosis between tertian and sub-  
malaria by the blood examination. In ordinary  
tertian infections, only young forms of the para-  
pproximately all the same age, are seen, and  
have not yet affected the size or appearance of  
d corpuscles. They may be very ameboid and  
ole closely young forms of the tertian parasite.  
a tertian infection, one group does not sporu-  
the same moment or hour, but the sporulation  
group covers from eight to twelve hours and  
sizes of the parasites can be seen correspond-  
the different ages of the individuals. For in-  
if the blood smear is made shortly after a chill,  
parasites, presegmentors and segmentors, and  
ameboid forms, all belonging to the same  
can be found. If the smear is made, say twelve  
after the chill, parasites ranging in age from  
hours to one-third grown forms can be found,  
so belonging to one group. Some of these will  
ve caused swelling and stippling of the red



corpuscles. This spread of the sporulation of a tertian group is not pointed out by the textbooks, which lead one to believe that the sporulation of all the individuals of a group occurs at approximately the same time. The variation in the age of the individuals furnishes one of the most important points in the differential diagnosis.



HARRY A. WYCKOFF, M. D. (Lane Hospital, San Francisco).—The reference to the extreme antiquity of the history of malaria is especially interesting.

It is said (Manson-Bahr) that the existence of periodic fevers was recognized by Hippocrates as early as the fifth century B. C., and that he classified them as quotidian, tertian, subtertian, and quartan.

It seems probable that at a remote period the Romans suspected the connection of an insect with the disease.

While, as stated by Doctor Reed, malaria remains a very important obstacle to the advance of the white man in certain regions of the earth, it seems certain that the prevalence of the disease even in these parts will eventually give way before intelligent sanitation, as it undoubtedly has in parts of the United States during the past ten or twenty years. Indeed the successful work of General Gorgas in Havana and Panama gives abundant promise for the white man's future in the tropics.

Bass<sup>1</sup> has estimated that even in the Southern States a 50 per cent decline in the prevalence of malaria has occurred within the last ten years, and points out that in New Orleans cases are now so few in some hospitals that the "greatest difficulty is experienced in finding enough material with which to teach medical students." He further states that "there has been no equal period during the history of the country in which malaria has declined anything like as rapidly as during the past ten years," and that "malaria is rapidly passing as an important disease of this country."



DOCTOR REED (closing).—In regard to the comment on the decreasing importance of malaria, the facts in

---

<sup>1</sup> Bass, C. C.: New Orleans Medical and Surgical Journal. Vol. 79, pp. 713-19, 1927.

opinion, do not at all bear out such a conclusion. California shares with the entire temperate and tropical world in the ravages of this greatest of tropical diseases. It is still a serious menace in California, and statistics give little evidence of ever being able to control the disease as a world problem. Its control would seem rather to lie in sanitary measures in districts such as California, where money and intelligent control are available, combined with vigorous treatment of all cases by individual physicians. Certainly malaria today is a primary world health problem and its ultimate control is far from assured at present. It is still present in California in serious proportions, and the physician must recognize the seriousness and the difficulty of dealing with it.



---

---

BONE PATHOLOGY AND ITS RELATION TO THE  
PROBLEM OF OTOSCLEROSIS.

BY MORITZ WEBER, M. D.,

FROM THE GEORGE WILLIAMS HOOPER FOUNDATION FOR MEDICAL  
RESEARCH, UNIVERSITY OF CALIFORNIA,†

SAN FRANCISCO.



Reprinted from ANNALS OF OTOTOLOGY, RHINOLOGY AND  
LARYNGOLOGY, December, 1928.

Vol. XXXVII. No. 4. Pages 1232-1256.

---

---





# BONE PATHOLOGY AND ITS RELATION TO THE PROBLEM OF OTOSCLEROSIS.\*

BY MORITZ WEBER, M. D.,

FROM THE GEORGE WILLIAMS HOOPER FOUNDATION FOR MEDICAL RESEARCH, UNIVERSITY OF CALIFORNIA,†

SAN FRANCISCO.

Research in pathology will succeed only if it is built upon a thorough knowledge of normal conditions. Normal histology is the foundation of histopathology. More particularly research in bone pathology requires a detailed knowledge of the construction of normal bone, which is the end-result of a slow and complicated process. Obviously its final formation cannot be properly interpreted without an understanding of this development. The pathologic changes in the bony system represent a repetition of the individual steps of the normal growth, or they may be enhanced by the addition of new developmental phases. Thus the contested questions of bone pathology are also those of normal bone histology.

What has just been stated concerning the bony system in general is of significance to the pathology of the bony capsule of the inner ear and consequently to the problem of otosclerosis. Research into the etiology of the latter requires a knowledge of the final construction and development of the bony capsule. As far as is known this development, in all probability, follows the general principles of bone formation.

## A. THE GENERAL PRINCIPLES OF NORMAL BONE FORMATION.

### I. THE UNDIFFERENTIATED BUT POTENTIAL, MESENCHYME CELLS.

The formation of the supporting system of the skeleton originates from special cells of the embryonic germinal tissue

---

\*Read in part before the Western Section of the American Laryngological, Rhinological and Otological Society at the Annual Meeting in Santa Barbara, California, April 21, 1928.

†This study was aided by grants from the John C. and Edward Coleman Memorial Fund.

(Lang, Schaffer). They are spindle cells with a clear nucleus, lying in an intercellular substance (Plate I, 1). According to Roux these undifferentiated but potential cells are destined to provide the skeletal system.

## II. THE DIFFERENTIATION OF THE MESENCHYME.

Between these cells the intercellular substance increases and invariably surrounds the cells in situ (Schaffer). Whether the differentiation of the intercellular substances is an active process is not entirely clear. According to Hueck, Herxheimer and others, this intercellular substance is not dead but is endowed with vitality and a metabolism and pathology of its own.

With regard to the skeleton formation there are at least two different types of intercellular substances. Even if one disregards its chemical composition and other properties, it must be recalled that one of them may be stained red with eosin (Plate I, 2) and the other blue with alum-hematoxylin (Plate I, 3).

## III. THE FORMATION OF "NUCLEI" AS CENTERS FOR THE DEPOSIT OF LAMELLAR BONE.



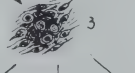
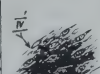




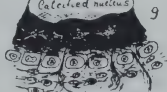



The gradual appearance of two different intercellular substances represents the first step in the development of a center for the subsequent formation of lamellar bone. The second stage is the calcification of this matrix, which as a center may be compared with the starting point of a crystal. For these centers I have chosen the designation "nucleus." Thus two general types of "nuclei" may be distinguished: The connective tissue "nucleus" (eosin-red matrix) and the cartilage "nucleus" (alum-hematoxylin-blue matrix). Since certain differences exist in the course of their development a more detailed consideration becomes necessary.

### (a) THE CONNECTIVE-TISSUE "NUCLEUS" (FIBRE-BONE).

The connective-tissue "nucleus" develops, as a rule, as follows: The cells imbedded in situ in the eosin-red matrix take on a jagged appearance. The intercellular substance shows an increased density and stains more deeply in the center. Finally the cells are connected by small anastomoses and the inter-

# PLATE I

## THE NORMAL DEVELOPMENT OF BONE

<p><u>I</u> The undifferentiated mesenchyme cells</p>	
<p><u>II</u> Differentiation and increasing of the inter cellular substance</p>	 
<p><u>III</u> Nucleus formation normal: 4) connective-tissue nucl. 6) perichondral nucl. 7) prim. enchondr. nucl. 8) sec. enchondr. nucl. [ pathological: 5) metaplastic nucl. ]</p>	    
<p><u>IV</u> The lamellar fibre-bone formation</p>	
<p><u>V</u> The resorption of bone</p>	
<p><u>VI</u> The shell-bone formation</p>	
<p><u>VII</u> The shell-bone transformation</p>	



cellular-substance diffuses to the undifferentiated cells (Schaffer). On the other hand, the fibrils of the surrounding connective-tissue penetrate into the enlarged and compact basic matrix and form there a dense, irregular mesh. As soon as the intercellular substance calcifies, the connective-tissue "nucleus" is completed (Plate I, 4).

The development of a connective-tissue "nucleus" is generally known as metaplastic bone. This designation, however, should be reserved for pathologic "nucleus" formation (as, for example, bone structures in tumors of the thyroid, etc.). The normal connective-tissue "nucleus" formation, as described above, is preferably referred to as calcified connective-tissue (Schaffer), rootstock (Gegenbauer) or fibre-bone (Weidenreich). Such connective-tissue "nuclei" are the starting points of the bones of the skull: os frontale, temporale, squama temporalis, the majority of the facial bones and the annulus tympanicus (Schaffer). Weidenreich, who uses the term fiber-bone, pointed out that it has also been found in the first layers of periosteal bone during its embryonal stage and invariably in the tendinous insertions. In order to avoid confusion the terms most frequently used in the literature for calcified connective-tissue are reviewed in Table I under column A. I have chosen the term connective-tissue "nucleus," since calcified connective-tissue, like calcified cartilage, is merely the first and preceding center of the subsequent lamellar bone. It must be remembered, as Weidenreich has shown, that the formation of the fiber-bone (connective-tissue "nucleus") does not require any special osteoblasts. Thus it stands in a striking contrast with the lamellar bone which, according to its mode of formation, could be called "bone formation by rows of osteoblasts."

#### (b) THE CARTILAGE "NUCLEUS."

The differentiated mesenchyme cells imbedded in situ in the blue matrix (alum-hematoxylin) are the starting point of the cartilaginous "nucleus" which develops as follows: The imbedded cells enlarge and assume a vesicular structure. Not infrequently several nuclei may be noted in one cell. At first the intercellular substance occupies a small space. In the course of further differentiation the tissue acquires a special form, which already possesses a general similarity to the fully developed

bone. In fact, the majority of bones have such a "cartilaginous model" (Plate I, 6) as a foundation. The lamellar bone is built on this model as a "nucleus." Since one "nucleus" is formed in the outer (perichondral "nucleus") as well as in the inner zones (enchondral "nuclei"), a more detailed discussion appears desirable.

#### 1. THE PERICHONDRAL "NUCLEUS."

The intercellular-substance between the cartilage cells calcifies on the surface layers of the model. This process terminates the formation of the perichondral "nucleus" (Plate I, 6).

#### 2. THE ENCHONDRAL "NUCLEI."

(aa) The Primary Enchondral "Nucleus."—In order that an enchondral "nucleus" may be formed the following conditions must be present. The cartilaginous "model"\* must be opened up by an invasion of blood vessels. For example, in the middle of the cartilaginous diaphysis of a long bone the cells enlarge and appear vesicular. The intercellular substance increases, becomes dense and stains more deeply. It is usually known as the point of calcification. Following this preparatory process blood vessels enter the cartilage model and take with them undifferentiated but potential connective-tissue cells (periosteal bud). As a consequence of this penetration the whole cartilaginous model is hollowed out and the primary marrow-space is the end-result. The formation of the marrow-space, however, ceases at the epiphyses of the cartilaginous models, which leads to the establishment of the well known epiphyseal lines. The intercellular-substance of the cartilage then calcifies (preparatory calcification). The cells arrange themselves in columns, enlarge, become vesicular and lose their cellular nuclei. Furthermore, they are eroded by capillary loops from the primary marrow-space. The calcified intercellular substance remains between the columns and represents the primary enchondral "nucleus" (Plate I, 7).

(bb) The Secondary Enchondral "Nucleus."—The epiphyses of the model remain cartilaginous temporarily but later open up (epiphyseal nucleus, ossification nucleus), and a secondary

---

\*The designation "model" has been described above.

TABLE I.  
THE NOMENCLATURE OF NORMAL BONE FORMATION.

	A	B	C
THE AUTHORS	1. THE SYNONYMS OF THE THREE TYPES OF BONE		
Gegenbauer (1864)	Connective-tissue bone (Bindegewebsknochen), interlaced embryonal bone (geflechtartiger, embryonaler Knochen)		
V. Ebner (1875)	Interlaced fiber bone (geflechtartiger Knochen)	Parallel fibrous bone (parallelfaseriger Knochen)	Lamellar bone (lamellöser Knochen)
Kölliker (1899)	Coarse fiber-bone (grobfaseriger Knochen)	Lamellar fibre bone (lamellöser Faserknochen)	
v. Eggeeling (1911)		Periosteal bone (Periostknochen)	Marrow bone (Markknochen)
Schäfer (1923)	Membrane-bone (intramembranous ossification)	Cartilage-bone	
Stöhr 1919)	Connective-tissue bone (Bindegewebsknochen)	Perichondral bone	Endochondral bone
Schaffer (1922)	Direct ossification, primary bone-formation, calcified connective tissue	Perichondral, periosteal bone-formation ('Deck' or 'Belegknochen')	Enchondral, endochondral, endostal or intracartilaginous bone

Weidenreich (1923)	Fiber-bone (Faserknochen)	(Fiber bone on tendinous insertions)	Shell-bone (Schalenknochen)
Weber (1923)	Connective tissue "nucleus," fiber-bone	Lamellar fiber bone	Shell bone (true lamellar bone)
2. THE SYNONYMS OF FORMED STRUCTURES			
Biedermann (1913)			Osteon (Haversian system)
Early authors		Outer general lamellae (äussere Generallamellen)	Inner general lamellae (innere Generallamellen)
Weidenreich (1923)		Periosteal lamellae (Periostlamellen)	Osteon lamellae (Osteonlamellen)
3. THE SYNONYMS OF RESIDUAL BONE			
Gegenbauer (1864)	Rootstock (Wurzelstock)		
Kölliker (1899)		True interstitial lamellae (echte interstitielle Lamellen)	Haversian lamellae (Haversische Lamellen)
Braus (1921)		False interstitial lamellae (unechte interstitielle Lamellen)	True interstitial lamellae (echte interstitielle Lamellen)
Weidenreich (1923)	Rootstock (Wurzelstock)	Fragments of periosteal lamellae (Periostfragmentlamellen)	Fragments of osteon lamellae (Osteonfragmentlamellen)



marrow-space appears. In the vicinity of the joint-surface the cartilage persists but it calcifies close to the secondary marrow-space. This calcified cartilage is the secondary enchondral "nucleus" (Plate I, 8). Some investigators believe that the cartilage cells in these areas are transformed into bone cells (metaplasia), while others doubt that this occurs (Schaffer, Borst, Stöhr).

From the foregoing discussion it is evident that four types of "nuclei" may be recognized: (1) The connective-tissue "nucleus"; (2) The perichondral "nucleus"; (3) The primary enchondral "nucleus"; (4) The secondary enchondral "nucleus." The first represents the calcified connective-tissue (fiber-bone) and the three others the calcified cartilage.

#### IV. THE GENERAL PRINCIPLES OF LAMELLAR BONE-FORMATION.

The lamellar bone is generally laid down on the "nuclei" mentioned above. There is only one mode of lamellar bone-formation, namely, through the activity of osteoblasts, which are arranged regularly, similar to a single row of epithelial cells. At first the excreted form of bone substance is soft (physiologic osteoid) but later it becomes calcified. In the completed bone the osteocytes are composed of the former osteoblasts.

However, according to v. Ebner, Kölliker and others, one may distinguish two types of lamellar bone: the lamellar fiber-bone and the lamellar bone. The former is laid down on the outside of the previously developed "nuclei." V. Eggeling has suggested the term periosteal bone for these layers. The true lamellar bone is deposited from the endosteum on the inside of the marrow-spaces (so-called marrow-bone by v. Eggeling). On the other hand, Weidenreich prefers the designation "shell-bone" (Schalenknochen) for the marrow-bone as well as for the lamellar part of the periosteal bone. In order to clarify the question of the nomenclature the important descriptive names are reviewed in Table I under B and C. In general the writer of this paper has followed the classification of v. Eggeling, who designates any bone, according to the origin of its development, into periosteal or marrow-bone. In accordance with the views of Kölliker, the writer prefers to use the term (a) lamellar fiber-bone for the parallel lamellar part of the periosteal bone (Table I, B) and the term (b) shell-bone of Weiden-

reich for the endosteal marrow-bone of v. Eggeling (Table I. C). It must always be remembered that each shell-bone and lamellar fiber-bone requires a "nucleus" as a foundation.

#### V. THE FORMATION OF LAMELLAR FIBER-BONE (PERIOSTEAL BONE).

The lamellar fiber-bone is formed on top of the "nuclei" in parallel layers. It is typical periosteal bone and is characterized by numerous connective-tissue fibers and vessels, which are imbedded as Sharpey-fibers and canals of Volkmann. Since the growth of the lamellar fiber-bone takes place on the outside it controls the thickness of the bone. The outer parallel layers are known as periosteal lamellæ.

#### VI. THE RESORPTION OF BONE.

The "nuclei" and the lamellar fiber-bone are slowly resorbed from the inside simultaneously as growth progresses. The main type of resorption is induced by osteoclasts (Kölliker), which attack the primary bone-material, probably by means of ferments, and thus induce the development of lacunæ (Howship's lacunæ) (Plate I, 10). According to Pommer also vessels may exhibit the ability of resorption by erosion (Plate I, 10). Whether true halisteresis occurs under normal circumstances is as yet undecided (Christeller).

#### VII. THE SHELL-BONE-FORMATION (ENDOSTEAL BONE).

The shell-bone is a lamellar bone formed by osteoblasts around blood-vessels leading to the well-known Haversian systems. It is exclusively formed from the endosteum upon walls of cavities (Plate I, 11). If the shell-bone on the walls increases, the diameter of these spaces decreases. Since the normal marrow is not fibrous the lamellæ of the shell-bone are free from connective-tissue-fibers.

From the foregoing it is evident that shell-bone may originate wherever vessels are included in spaces surrounded by "nuclei" or lamellar fiber-bone or wherever vessels enter spaces resulting from former processes of resorption.

As growth proceeds the shell-bone takes the place of all the previously formed hard-substances ("nuclei" and lamellar fiber-bone). The shell-bone is the highest unit of bone-formation. Biedermann, who compared the bone-unit with the nerve-

unit, designated the Haversian canals as osteons. In all probability mechanical stimuli influence the direction of the vessels and consequently guide the arrangement of the osteons. The inner layer of shell-bone around the marrow cavity is called the inner general-lamellæ or better "osteon lamellæ of the marrow" (Weidenreich). Since during infantile life shell-bone is principally formed in the epiphyseal line, it controls the growth of the long bones along their longitudinal axis.

#### VIII. THE TRANSFORMATION OF SHELL-BONE.

In the course of skeletal development the early formed osteons are slowly resorbed. The spaces formed as a result of this process are filled with new shell-bone. According to Weidenreich, the remains of the osteons are designated as fragments of osteon-lamellæ. In advanced age the lumina of the osteons are narrow and finally they may be completely obliterated.

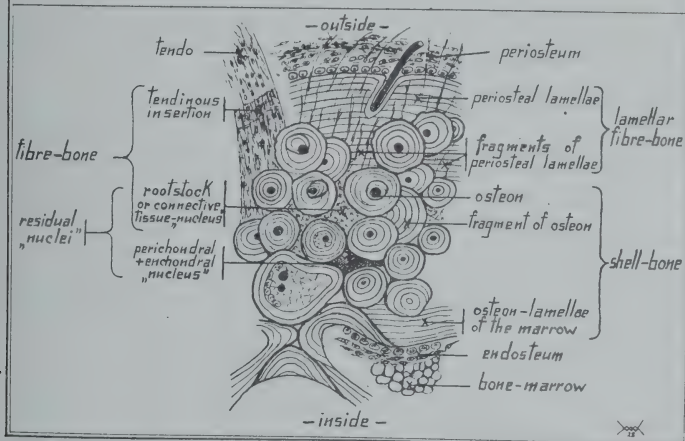
#### IX. THE END-RESULT OF BONE-DEVELOPMENT.

A completed bone reveals a complicated histologic picture which cannot be appreciated if one does not thoroughly understand the various phases of its development. This statement may be best illustrated on a transverse section of a human long bone of an infant (Plate II). It will be noted that an overlapping of all the stages mentioned in the preceding paragraphs is present. The outer or subperiosteal parts are lamellar fiber-bone (periosteal lamellæ), except in those areas in which tendinous insertions (fiber-bone) are attached. Lamellar fiber-bone and tendinous insertions are replaced from within by shell-bone and thus fragments of periosteal lamellæ and fragments of fiber-bone (rootstock or connective-tissue "nucleus") remain. Under certain conditions processes of resorption may lead to the formation of Haversian spaces. Towards the marrow one may observe a conglomerate mass composed of osteons, whole or fragmentary, and the remains of the perichondral "nucleus." Close to the marrow one finds the osteon-lamellæ of the marrow which continue into the spongiosa.

#### B. THE GENERAL PRINCIPLES OF ABNORMAL BONE-FORMATION.

In general, under pathologic conditions, bone-formation and resorption exceeds the normal rate, but in principal the process

**PLATE II**  
**TRANSVERSE SECTION OF A HUMAN LONG BONE**  
**[INFANTILE AGE]**





is a repetition of the normal (M. B. Schmidt). However, a few new phases may be observed: the normal apposition may be enhanced by a process known as metaplasia, the normal resorption may possibly be replaced either by halisteresis or by perforating canals. In order to appreciate the abnormal conditions of bone development they must be compared with the normal phases.

#### I. THE PATHOLOGY OF THE UNDIFFERENTIATED BUT POTENTIAL MESENCHYME CELLS.

Hereditary factors may influence the germinal tissue leading to disturbances in the undifferentiated but potential mesenchyme cells. The latter may lack the ability to form the supporting system required for proper bone development. Dwarfism may be the end-result (nanosomia primordialis). On the other hand, these cells may develop their tendency to form bone in places in which such substance should not normally occur (neoplasm).

#### II. THE PATHOLOGY IN THE DIFFERENTIATION OF THE INTERCELLULAR SUBSTANCE.

An abnormal appearance and increase in intercellular substances is frequently observed. There may be a direct deposition of soapy material ("Fettkalk," Aschoff) or of a substance which later becomes calcified. Such deposits may follow inflammation, necrosis and disturbances of the protein-fat-carbohydrate or mineral-metabolism. The tissue cells are imbedded in situ. This process may pave the way for "metaplastic" bone formation.

#### III. THE PATHOLOGY IN THE "NUCLEUS" FORMATION.

##### (a) DISTURBANCES OF THE NORMAL PROCESS.

Disturbances of the normal "nucleus" formation are mostly due to deficient calcification. A complete absence of lime deposits in the cartilage "nuclei," the etiology of which is unknown, may be seen in chondrodystrophia foetalis. An incomplete calcification in the preparatory zone (see p. 8) is observed in rickets. Deficient calcification of the "nuclei" may also be the result of endocrine disturbances as observed in

nanosomia pituitaria, nanosomia athyreotica. A rapid and increased calcification has been found in gigantism.

(b) THE PATHOLOGIC APPEARANCE OF "NUCLEUS" FORMATION  
("METAPLASIA".)

According to Borst, metaplasia represents the development of a fully established tissue into one of a different character. In a general way, metaplasia is a throwback to ontogenetic and phylogenetic phases of development. The question of the metaplasia of connective-tissue into bone-substance is of the greatest significance in the study of otosclerosis and allied conditions. The metaplasia of cartilage to bone has not as yet been proven (Borst).

Personal observations on "metaplastic bone" have shown that the major part of this structure is in reality a calcified connective-tissue "nucleus" surrounded by lamellar bone. Therefore a sharp differentiation always must be made between the pathologic "nucleus" formation and the subsequent enlargement of the "nucleus" by either lamellar fiber-bone or shell-bone. Wherever in the body intercellular-substances, such as hyalin, colloid, collagen, etc., make their appearance as a result of pathologic processes "nuclei" formation may take place provided the substance becomes calcified. Any tissue may thus develop into a center for subsequent bone formation (Plate I, 5). Should such a process occur within the region of end- or peri-osteum in which bone formation is normal the calcification of fibrous tissue should be designated as fibroblastic bone formation (Askanazy, Bauer, Christeller, Gruber).

IV. THE PATHOLOGY OF THE LAMELLAR BONE.

(a) THE FORMATION OF LAMELLAR BONE AROUND A META-  
PLASTIC "NUCLEUS."

Lamellar bone formation around a metaplastic "nucleus" can occur only if specially differentiated cells are present which can acquire the property of osteoblasts. Such conditions evidently exist in tumors, epulis, in chronic inflammatory tissues and in callus formation. On the outside of the "nucleus" connective-tissue fibers are likewise embedded, leading to a real periosteal lamellar fiber-bone. On the inside, however, where

marrow spaces are formed shell-bone formation occurs around blood vessels.

(b) THE DISTURBANCES OF THE LAMELLAR FIBER-BONE  
(PERIOSTEUM).

The most frequent disturbance of the periosteal bone is an intensified ossification which increases the diameter of the corticalis. Such conditions may be found during the fetal period in chondrodystrophia foetalis, during youth as a result of hereditary syphilis (periostitis) and in rickets (osteophyte). A thickening of bone during advanced age is mostly due to chronic inflammatory processes, chronic intoxications or venous stasis. It has been observed, according to M. B. Schmidt, as a result of: (1) chronic lung diseases, (2) cardiac defects with venous stasis, (3) syphilis, actinomycosis, leprosy, (4) chronic icterus, (5) tumors (exostosis), (6) phosphorus and arsenic poisoning, (7) leucemic and pseudoleucemic diseases, (8) chronic inflammatory processes of the bone marrow. The newly formed bone is in its first stage a fiber-bone, as Weber has shown in cases of osteomyelitis and syphilis. Thickening of the bone also occurs in the hyperostotic forms of osteodystrophia fibrosa (ostitis fibrosa, Paget's disease). This enlargement is, however, not an autonomous inflammatory periosteal process, as is the case, for example, in syphilis (L. Pick, Wilhelm and Weber).

A reduction of periosteal ossification may decrease the corticalis. It is found in osteogenesis imperfecta (Knaggs, M. B. Schmidt and v. Recklinghausen) and in the two vitamin deficiencies, Möller-Barlow (E. Fraenkel), and scurvy (Aschoff-Koch). Since the endosteal bone formation is also affected, spontaneous fractures may frequently result. According to Pommer, simple decrease of the periosteal ossification rarefies the cortical layers, even if the resorption does not exceed the normal (inactivity, neurotic and senile atrophy).

(c) THE DISTURBANCES OF THE SHELL-BONE (ENDOSTEUM).

In case the bone development remains in the stage of the cartilaginous model and the formation of shell-bone is diminished or entirely absent, dwarfism has been observed. An

early cessation of endosteal ossification has been described by M. B. Schmidt in cretinism. A diminished endosteal bone development is seen in osteogenesis imperfecta, Möller-Barlow disease and in scurvy. A decrease of endosteal apposition induces inactivity, neurotic and senile atrophy. When combined with the absence of periosteal apposition spontaneous fractures may occur.

A very important disturbance of shell-bone formation is its deficiency in calcification, which leads to the apposition of osteoid. This latter tissue is invariably found in natural and experimental rickets (MacCollum, Stepp and György) and in osteomalacia, and may be present or absent in osteodystrophia fibrosa (Askanazy, Christeller). While the new formed bone is soft it induces, for example, the osteomalacic pelvis or bow legs in rickets. Disturbances in the costo-chondral junction leading to the formation of a rosary are not specific for rickets, since they have been observed in osteodystrophia fibrosa of animals by Christeller and in scurvy by Wimberger.

The shell-bone is influenced by the conditions existing in the bone marrow. Inflammatory processes of the marrow and venous stasis produce a proliferation of the endosteum which may close the marrow cavity, as seen in cases of syphilis or osteomyelitis. In this regard also the osteodystrophia fibrosa is of the greatest importance. Here the bone marrow is transformed into fibers. Islands of fibers calcify, forming connective-tissue "nuclei" (fibroblastic bone). Very often, however, they do not completely calcify, thus giving rise to the fibroblastic osteoid. In these cases the shell-bone formation may be entirely absent, as personal observations have shown on polished sections made from specimens of a hyper-ostotic-porotic form of osteodystrophia fibrosa. The first sign of healing is the beginning of shell-bone formation, which can exceed the normal to such a degree that it may lead to sclerotic bone which may be as hard as ebony (Christeller). Eburnization is also common in the course of other chronic processes, such as chronic syphilis and osteomyelitis. In fact, the narrowing and calcification of the Haversian systems may be so extensive, even at an early age, that the vessels become completely obstructed.



## V. THE PATHOLOGY OF RESORPTION.

## (a) DISTURBANCES OF NORMAL RESORPTION.

Increased resorption of bone substance by osteoclasts is one of the most frequent disturbances of resorption. It is a common process in the inflammation of bone, in the invasion of tumors, in pressure atrophy (hydrocephalus, aortic aneurysm), in the resorption of calluses and in functional changes. An increase of the activity of osteoclasts also occurs in the hypostotic form of the osteodystrophia fibrosa.

## (b) THE APPEARANCE OF NEW TYPES OF RESORPTION.

1. Vascular Resorption.—M. B. Schmidt believes that the penetrating canals are a sign of resorption because the vessels proceed recklessly through the bone and also through the shell-bone; Axhausen, Christeller, Weidenreich and others, however, are of the opinion that the vessels are retained in the bone substance (canals of Volkmann)\* and are therefore the result of apposition. In any case, as Pommer has pointed out, the vessels are endowed with the ability to erode bony substance by means of their walls.

2. Halisteresis.—By halisteresis is meant a diffuse decalcification which Recklinghausen calls "trypsis" and believes to be a factor in osteomalacia. According to Axhausen, Konjetzny, Lang, Looser, Pommer and Schmorl, it is questionable if such a process really exists. Christeller, however, observed it in the neighborhood of an echinococcus cyst, and Gottlieb in the diffuse atrophy of the alveolar bone. Since technical methods are not available to prove either decalcification or incomplete calcification, the final decision must remain in abeyance.

## C. THE NORMAL GROWTH OF THE OSSEOUS CAPSULE OF THE LABYRINTH.

## I. THE NORMAL DEVELOPMENT.

The bony labyrinth is formed upon a cartilaginous model. To avoid repetition this development is presented in the form of a scheme (Plate III and Table II), which is based upon the work of Eckert-Moebius, described in the handbook of Henke-Lubarsch (Volume XII). Eckert-Moebius follows the monographs of Meyer, Wittmaack, Kosokabe. It has been the aim

# PLATE III

## THE NORMAL DEVELOPMENT OF THE BONY CAPSULE OF THE LABYRINTH AND THE OTOSCLEROSIS

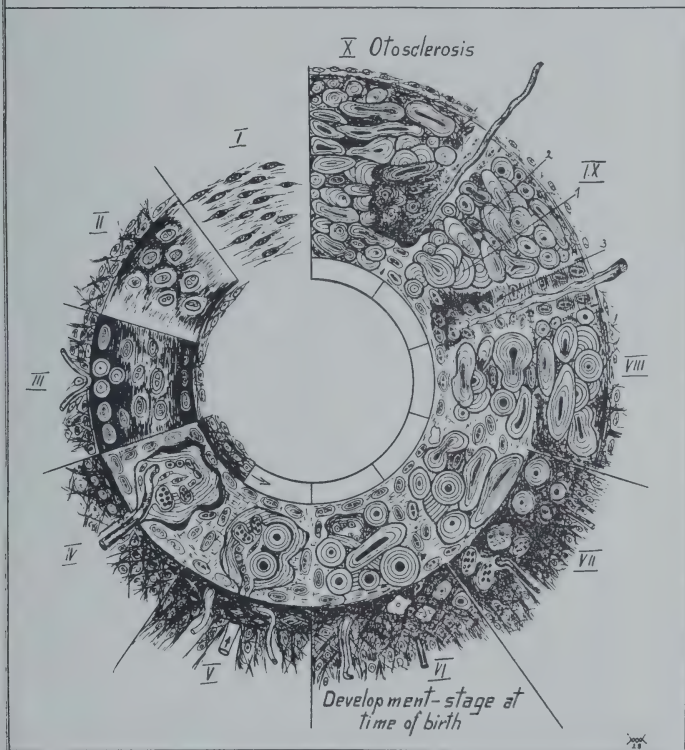


TABLE II.  
THE NORMAL DEVELOPMENT OF THE BONY CAPSULE OF THE LABYRINTH.  
EXPLANATION OF PLATE III

	The Outer Layer: Periosteal Ossification	The Middle Layer: Enchondral Ossification	The Inner Layer Endosteal Ossification
	Stage of Undifferentiated Mesenchyme Cells		
I			
II	Undifferentiated mesenchyme cells	Differentiation and increase of inter-cellular substance. Formation of the "cartilaginous model"	Undifferentiated mesenchyme cells
III	Preparatory calcification of the intercellular substance on the outside of the cartilaginous model (perichondral "nucleus")	Cartilaginous model	Preparatory calcification of the intercellular substance on the inside of the cartilaginous model
IV	Beginning of the fiber-bone formation	Opening of the cartilaginous model through a periosteum-bud and building of large marrow spaces. Preparatory calcification and building of the enchondral "nucleus." Beginning of shell-bone formation upon the enchondral "nucleus." Resorption of the primary formed material	Formation of a few layers of calcified connective tissue (fiber bone) on the inside

V	6-7 fetal month	Continuous formation of fiber bone	Continuous shell-bone formation. Transformation of primary and lymphoid bone marrow into fat marrow
VI	Development stage at time of birth	Finished fiber-bone formation, which stains red with eosin	Advanced shell-bone formation. Small marrow spaces filled with fat marrow
VII	Development during the 1-2 year	Intensive resorption of the fiber-bone (ostoclasts). Filling of resorbed spaces by compact lamellar bone. Fragments of periosteal lamellae between the new-formed shell-bone.	Progressive building of shell-bone. In the cartilaginous partitions. Replacement of the cartilaginous partition before the oval window by lamellar bone
VIII	Juvenile stage	Hard. compact shell-bone	1. Hard. compact shell-bone, with a great number of vessels 2. Resistance of interglobular spaces 3. Permanent cartilaginous partitions
IX	Adult and senile stage	Sclerosis of the shell-bone with narrowing of vessel spaces	Calcification of residual cartilage. Early signs of age. Sclerosis of the shell-bone with obstruction of the vessels



of the writer especially to consider German publications dealing with bone pathology in order to present to American readers some of the more recent contributions in this field which have not as yet been generally reviewed.

## II. THE NORMAL STRUCTURE.

The final state of the bony capsule is seen in VIII and the advanced stage in IX of Plate III and Table II.

### D. OTOSCLEROSIS.

#### I. THE MORPHOLOGIC PICTURE.

The cause of otosclerosis, which is the subject of our investigations, is unknown.

The views regarding its usual genesis (histogenesis) are not in accord, but the end-picture of otosclerosis, as seen in a histologic section, is well known. Politzer was the first to express the view that otosclerosis is an idiopathic disease of the bony labyrinth. The term otosclerosis better describes the process than "progressive deafness." On this account the pathologist prefers the designation "otosclerosis" rather than the purely clinical expression, "progressive deafness," since, according to Lange, only a few cases with otosclerosis lead to clinical deafness.

Otosclerosis is a focal disease, which is usually bilateral. The resulting deafness may occur in several ways, the most frequent having its seat in the middle ear, due to ankylosis of the stapes. The other type is due to a pressure atrophy of the auditory nerve as a result of encroaching processes of the bone. As a result of the latter an inner ear deafness may develop.

In some cases middle ear deafness may be combined with inner ear deafness. According to Wittmaack, processes on the endosteum may change the Ca-ion-concentration of the fluid of the labyrinth and thus induce lesions of the end-cells of the auditory nerve, which may result in inner ear deafness without pressure atrophy of the nerve.

The histologic picture, according to Lange, is characterized by the following: In the focal lesion one may note an intermingling of fibrous and lamellar bone; interglobular spaces are

absent. Having recognized this fact, it is quite evident that the entire anatomic problem of otosclerosis is one of bone pathology which can be solved only if one keeps in mind the development and formation of normal bone.

The foci in the bony capsule are sharply defined against the enchondral labyrinth by means of a cementum line. The surrounding bone of the middle layer shows no changes. In fact, the focus rests in a self made space between the enchondral and periosteal bone. The primary process of the disease is, in all probability, one of resorption, which proceeds slowly towards the periosteal bone. There is, however, no limitation to the periosteal bone. Furthermore, it is of paramount interest that the foci occur in selected places and most frequently in the region of the fenestra ovalis.

## II. THE THEORIES OF OTOSCLEROSIS.

The principal theories of otosclerosis consider the problem from the standpoint of bone pathology.

Siebenmann was the first to explain the foci in the bony capsule as processes of "neospongification." This interpretation is readily understood if one compares the foci with the secondary marrow space formation of the long bone. In otosclerosis the areas are later filled with unorganized bone. Brühl and Wolf consider otosclerosis as a process of exostosis which in turn may be compared with the tumor-like fiber-bone formation not infrequently observed in the long bones. Lange and O. Mayer see in the otosclerotic process a tumor-like hypertrophy on the basis of a hereditary, localized tissue malformation. To be sure, Mayer compares it with neurofibromatosis and proposes the designation osteofibroma or osteofibromatosis. Manasse blames early inflammatory processes as the cause of otosclerosis, since he found leucocytes in the otosclerotic foci. In his monograph (1912) he has chosen the term "ostitis chronica metaplastica"; this indicates the importance of the metaplasia problem in its relation to otosclerosis.

According to the review given by Drury, disturbances of the endocrine glands, inflammatory processes and possibly rickets may be responsible for otosclerosis.

Wittmaack, taking an entirely different viewpoint, considers localized venous stasis, which may produce halisteresis, as the

cause of otosclerosis. The correctness of his view may be verified by a consideration of the principles underlying halisteresis and disturbances in the periosteal processes due to venous stasis. In this connection one may recall the phlegmatoplastic malacia of v. Recklinghausen.

The relation of the cartilaginous remnants to the otosclerotic foci is suspected by Bast, Manasse, Stötz. On the other hand, O. Mayer is of the opinion that the cartilage remnants around the fenestra ovalis are less important than the cartilaginous partitions. It is in these areas that the connective tissue processed radially and produces fibrous bone; the end-result is again a "metaplastic" process.

Alexander believes that otosclerotic foci may already be present in the newborn, or even in the fetus. He found typical otosclerosis in a cretinous dog.

In this brief sketch an attempt has been made to illustrate the intimate relationship of bone pathology to otosclerosis. Progress made in the former will unquestionably enhance our knowledge of the latter. But since otosclerosis is not merely a problem of pathology, any progress which may be made in the various branches of biology will undoubtedly help to clarify the many mysteries with which the field of otosclerotic deafness is surrounded. To solve the problem, as Fraser and Pritchett have repeatedly pointed out, one needs the close cooperation of all the specialists concerned.

The otologist must conduct a specialized examination of the ear, collect detailed histories of every case of otosclerosis, including such data as previous infectious diseases, hereditary, dietary and environmental factors, etc. Next the internist should study the otosclerotic patient in order to establish any relationship between otosclerosis and general disturbances in the body as a whole. Then the biochemist must study the metabolism of the deafened in order to discover if a specific disturbance in the Ca and P ratio may induce the process. The pathologist finally studies the morphologic changes in the ear and in the other organs as well. He must examine the whole bony system in order to determine whether changes in the skeleton parallel those of the labyrinth.

Unfortunately, this deductive analytic method of investigation has its limitations, since suitable clinical material for a complete study is rarely available. Not infrequently, a case studied thoroughly by the clinician and biochemist cannot be investigated by the pathologist, since only an incomplete autopsy may be permitted. It therefore appears advisable to produce the disease experimentally. By this means the effect of various factors on the bony system as a whole, and on the labyrinth in particular, can be studied under carefully controlled conditions. In order to correlate clinical findings with anatomic lesions it is of the utmost importance that a standardized method be devised, if possible, by psychologists for testing the hearing of the various animal species used in otologic investigations.

Should it be possible to reproduce otosclerosis experimentally excellent leads for the therapy would be secured.

## BIBLIOGRAPHY.

1. Aschoff, L., Koch, W.: *Skorbut*. Jena, Fischer, 1919.
2. Askanazy, M.: *Über Ostitis deformans ohne osteoides Gewebe*. Arbeiten aus dem pathol. Institut Tübingen, 1903, 4.
3. Axhausen, G.: *Über den Begriff der Halisterese und über die Knochendystrophie*. Arch. f. klin. Chir., 1911, 94, 281.
4. Barlow, R. A.: *Does Vitamin Deficient Diet Cause Deafness? Results of Animal Experimentation*. Laryngoscope, 1927, 37, 640.
5. Bast, T. H.: *Early Development of the Bony Capsule of the Human Ear*. Laryngoscope, 1927, 37, 652.
6. Bauer, W.: *Die Appositions und Resorptionsvorgänge an Knochen und Zähnen*. Ztschr. f. Stomatol., 1925, 23, 188.
7. Borst, M.: *Metaplasie*. In Aschoff: *Pathologische Anatomie*. Jena, Fischer, 1928, I, 649, I, 619.
8. Braus, H.: *Anatomie des Menschen*. Berlin, Springer, 1921.
9. Christeller, E.: *Die Formen der Ostitis fibrosa*. Ergebn. d. allg. Pathol. u. path. Anat. Wiesbaden, Bergmann, 1923, 20, II, 1 (Lit.).
10. Christeller, E.: *Referat über die Osteodystrophia fibrosa*. Verhandl. d. deutsch. path. Gesellsch., 1926, 21, 7 (Lit.).
11. Dietrich, A.: *Grundriss der allgemeinen Pathologie*. Leipzig, Hirzel, 1927.
12. Drury, D. W.: *Ostosclerosis*. ANNALS OF OTOTOLOGY, RHINOLOGY AND LARYNGOLOGY, 1926-1927, 35, 651 (Lit.).
13. Eckert-Moebius, A.: *Die pathologisch-anatomische Untersuchungstechnik und die normal-histologischen Grundlagen*. In Henke-Lubarsch, *Handb. d. spez. path. Anat. u. Hist.* Berlin, Springer, 1926, 12 (Gehörorgan) 1 (Lit.).



14. v. Eggeling, H.: Der Aufbau der Skeletteile in den freien Gliedmassen der Wirbeltiere. Untersuchungen an urodelen Amphibien. Jena, 1911.
15. Falta, W., Meyers, M. K.: Endocrine Diseases. Philadelphia, Blakiston's Sons, 1923.
16. Fraenkel, E.: Die Möller-Barlowische Krankheit. Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen, 1908, Ergnznsgsbd., 18.
17. Frangenheim, P.: Korreferat über Die Klinik der Osteodystrophia fibrosa, Verhandl. d. deutsch. path. Gesellsch., 1926, 21, 49.
18. Fraser, J. S.: Plea for an International Investigation Into Otosclerosis and Allied Forms of Deafness. Laryngoscope, 1923, 33, 891.
19. Fraser, J. S.: Deafmutism, Author's Abstract. Laryngoscope, 1923, 33, 177.
20. Gottlieb, B.: Die diffuse Atrophie des Alveolarknochens. Ztschr. f. Stomatol., 1923, 21, 195.
21. Gruber, G. B.: Anmerkungen zur Frage der Weichteilverknöcherungen besonders der Myopathia osteoplastica. Virchows Arch. f. path. Anat., 1926, 260, 455.
22. Häupl, K., Lang, F. J.: Die marginale Parodontitis. Berlin, Meusser, 1927.
23. Herxheimer, G.: Krankheitslehre der Gegenwart. Dresden, Steinkopf, 1927, 17.
24. Kaufmann, E.: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie. Berlin und Leipzig, 1922, I, 816 (Lit. II, 1826).
25. Knaggs, R. L.: Diseases of Bone. N. Y., William Wood, 1926.
26. Kölliker, A.: Handbuch der Gewebelehre. Leipzig, Engelmann, 1899.
27. Lange, W.: Die atrophischen, dystrophischen und degenerativen Erkrankungen der Labyrinthkapsel. In Henke-Lubarsch, Handb. d. spez. path. Anat. u. Hist., Berlin, Springer, 1926, 12 (Gehörorgan), 415 (Lit.).
28. Pick, L.: Über Otitis fibrosa. Klin. Wochenschr., 1923, 11, 1044.
29. Pritchett, H. S.: The Problem of Progressive Deafness. Laryngoscope, 1927, 37, 632.
30. Pommer, G.: Bemerkungen zu den Lehren vom Knochenschwund. Arch. f. mikr. Anat. u. Entwicklungsmechn., 1924, 102, 324.
31. Pommer, G.: Über Osteoporose, ihren Ursprung und ihre differential diagnostische Bedeutung. Arch. f. klin. Chir., 1925, 136, 1 (Lit.).
32. v. Recklinghausen, Fr.: Untersuchungen über Rachitis und Osteomalazie. Jena, Fischer, 1919 (Lit.).
33. Roux, W.: Gesammelte Abhandlungen über Entwicklungsmechanik der Organismen. I, II, Leipzig, 1895.
34. Schäfer, E. A.: Textbook of Microscopic Anatomy. Longmanns, Green, 1912.
35. Schaffer, J.: Lehrbuch der Histologie und Histogenese. Leipzig, Engelmann, 1922.
36. Schmidt, M. B.: Referat über Rachitis und Osteomalazie. Verhandl. d. deutsch. path. Gesellsch., 1919, 13, 3 (Lit.).

37. Schmidt, M. B.: Der Bewegungsapparat. In Aschoff: Lehrbuch der Pathologie. Jena, Fischer, 1928, II, 184.
38. Schmorl, G.: Zur Kenntnis der Ostitis fibrosa. Verhandl. d. deutsch. path. Gesellsch., 1926, 21, 71.
39. Siegmund, H.: Bemerkungen über die Entwicklung ostoklastischer Resorptionsgewebe und die Riesenzelleneupulis. Verhandl. d. deutsch. path. Gesellsch., 1926, 21, 86.
40. Siegmund, H. und Weber, R.: Pathologische Histologie der Mundhöhle. Leipzig, Hirzel, 1926.
41. Stepp, W. und György, P.: Avitaminosen. Berlin, Springer, 1927 (Lit.).
42. Stöhr, Ph.: Lehrbuch der Histologie. Jena, Fischer, 1919.
43. Weber, M.: Schliffe von mazerierten Röhrenknochen und ihre Bedeutung für die Unterscheidung der Syphilis und der Osteomyelitis von der Osteodystrophia fibrosa sowie für die Untersuchung fraglich syphilitischer prähistorischer Knochen. Beitr. z. path. Anat. u. z. allg. Pathol., 1927, 78, 441.
44. Weidenreich, F.: Knochenstudien I, II. Ztschr. f. d. ges. Anat., 1923, 1. Abt. 69, 382, 558.
45. Wilhelm, S. F. W.: Osteitis fibrosa and the hyperostotic form of bone syphilis. Surg. Gynec. Obst., 1925, 41, 624.
46. Wimberger, H.: Die Spätdiagnose des Säuglingsskorbut. Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen, 1924, 32, 17.













Einzelne nicht im Buchhandel.

Ueberreicht vom Verfasser.

---

---

Abdruck aus

**Beiträge zur pathologischen Anatomie und zur  
allgemeinen Pathologie**

Begründet von Ernst Ziegler

Herausgegeben von L. Aschoff, Freiburg i. Br.

Bd. 82

Verlag von Gustav Fischer in Jena

1929

---

---



Soeben erschien:

# Mikroskopische Untersuchungen über Gelenkgicht

Von

Prof. Dr. G. Pommer

Innsbruck

Mit 102 Abbildungen im Text

VII, 168 S. gr. 8°

1929

Rmk 12.—

Inhalt: 1. Vom Gegenstande der vorliegenden Gelenkgichtuntersuchungen, ihrem Verlauf und Entkalkungsverfahren und von den damit hergestellten Uebersichtsdurchschnitten. / 2. Von meinem Färbungsverfahren bei diesen Gelenkgichtuntersuchungen. / 3. Von den Uratablagerungen und ihren Rückstandsbefunden in Gelenkknorpeln und Sehnen, in synovialen Gewebsausbreitungen und Tophusgewebsbildungen im allgemeinen, auch unter Einbeziehung von Knochenmarkbefunden. / 4. Von den mikroskopischen Gichtbefunden der Gelenkkapsel und im besonderen der Synovialhaut in ihren Beziehungen zum Gelenkknorpel und zur Knorpelknochengrenze. / 5. Von den mikroskopischen Befunden der untersuchten Gelenkkörper im Bereiche ihres Periosts, Knochenmarkes und -gebälkes, nebst weiteren Beiträgen zur Kenntnis der Knorpelknochengrenze und Schlussbemerkungen. / 6. Zusammenfassung der hauptsächlichsten Ergebnisse. — Literaturverzeichnis.

Um ganz zutreffende Vorstellungen von den Ablagerungsverhältnissen der Urate in den Geweben zu erhalten, müssen diese Ablagerungen und Herde tunlichst unverändert in den von den Gelenkkörpern und sonstigen Gelenkbestandteilen herzustellenden Schnittpräparaten erhalten bleiben. Aber es müssen doch auch den Gelenkkörpern behufs Anfertigung übersichtlicher Gelenkdurchschnitte die Knochensalze in dem zur Schnittfähigkeit erforderlichen Maße entzogen werden.

Nach vielen Versuchen glückte es dem Verfasser, ein Untersuchungsverfahren zu finden, das neben dem Nachweis der Uratbestände die Kalkablagerungsverhältnisse im betreffenden gichtischen Gelenk kennzeichnet, andererseits aber auch bei nachträglicher Auflösung der Urate deren Rückstände in verlässlicher Weise wiedergibt.

An den nach diesem Verfahren hergestellten übersichtlichen Celloidinschnitten war die Möglichkeit geboten, sowohl die im Knorpel und Knochenmark, Knochen und Periost als auch die in der Synovialhaut und ihren Ausbreitungen, sowie in den Sehnen- und Bandansätzen vorhandenen Uratablagerungen und Tophusbildungen zur Darstellung zu bringen und in ihren Auswirkungen zu verfolgen.

Die Untersuchungen führten zu folgendem Ergebnis: je mehr die Gelenkgicht zur Ausbildung gelangt und sich auswirkt, und je mehr sie sich zu ihrem schließlichen Zustandsbild gediehen zeigt, um so weniger entsprechen ihre Befunde denen der Arthritis deformans und finden sie sich mit solchen vergesellschaftet; die verschiedenen, den weiteren Verlauf der Gelenkgicht bestimmenden Komplikationen, die Einbrüche und Einknickungen des inkrustierten und synovialen Gewebsausbreitungen verfallenen Gelenkknorpels und die synovitischen Gelenkverschließungen schalten von vornherein die weitere Ausbildung von Arthritis deformans-Veränderungen aus.

*Nachdruck verboten.  
Übersetzungsrecht vorbehalten.*

## XV.

steodystrophia fibrosa, ihre pseudotumor- und  
ystenbildende, juvenile, hyperostotisch-poroti-  
sche Form beim Hund, zugleich ein Beitrag  
zur Frage ihrer Pathogenese und Ätiologie.<sup>1)</sup>

Von

**Moritz Weber.**

Aus: The George Williams Hooper Foundation for Medical Research,  
University of California, San Francisco.

**Mit 31 Abbildungen im Text.**

*(Eingegangen am 18. März 1929.)*

### Inhaltsübersicht.

	Seite
Leitung . . . . .	2
A. Bericht über den eigenen am Bostonterrier beobachteten Fall . . . . .	6
I. Die Familien- und Krankengeschichte . . . . .	6
II. Der allgemeine Status . . . . .	7
III. Das Knochensystem (Schädel, Extremitäten, Rumpf) . . . . .	7
a) Makroskopischer Befund . . . . .	7
b) Mikroskopischer Befund . . . . .	10
IV. Der Befund an den inneren Organen . . . . .	32
B. Einordnung des Falles in das morphologische System der malacischen Knochenerkrankungen . . . . .	34
I. Die Diagnose . . . . .	34
II. Die Differentialdiagnose gegenüber:	
a) Rachitis . . . . .	37
b) Osteomalacie . . . . .	38
c) MÖLLER-BARLOW, Skorbut, Osteoporosen und progressiver Knochen- atrophie . . . . .	39

<sup>1)</sup> Unterstützt — JOHN C. and EDWARD COLEMAN Memorial Fund.

C. Beitrag zur Pathogenese der generalisierten Osteodystrophia fibrosa . . .	
I. Die Aufgabestellung . . .	
II. Die funktionellen Phasen der normalen Knochenentwicklung . . .	
III. Die Störungen der funktionellen Phasen bei der Osteodystrophia fibrosa	
a) Der Schalenknochen . . .	
b) Die „Kerne“ . . .	
1. Der Faserknochen . . .	
2. Der Knorpel . . .	
c) Die Differenzierung . . .	
d) Das undifferenzierte mesenchymale Gewebe (Grundstufe). . .	
e) Die Resorption . . .	
IV. Das Wesen der Osteodystrophia fibrosa . . .	
a) Das Wesen im allgemeinen . . .	
b) Die Pseudotumoren . . .	
c) Die Cysten . . .	
V. Der Verlauf der Osteodystrophia fibrosa . . .	
a) Der Ausgangspunkt . . .	
1. Der funktionelle Ausgangspunkt . . .	
2. Der örtliche Ausgangspunkt . . .	
b) Der Höhepunkt . . .	
c) Die Ausheilung . . .	
D. Gedanken über die Ätiologie der Osteodystrophia fibrosa . . .	
I. Die Stoffwechselstörung . . .	
II. Der Wert des Diätversuchs . . .	
III. Die Aufgabe des Diätversuchs . . .	
IV. Die Bedeutung des erfolgreichen Diätversuchs für die Praxis . . .	
Zusammenfassung . . .	
Literaturverzeichnis . . .	

## Einleitung.

Die Osteodystrophia fibrosa des Hundes ist im letzten Jahrzehnt mehrfach eingehend beschrieben worden. Demnach sind zwei Erscheinungsformen dieser Erkrankung beim Hund sicher bekannt: 1. eine juvenile hypostotisch-porotische Form (CHRISTELLER) und 2. eine senile, hypostotisch-porotische Form (L. PICK und SCHMEY). Eine dritte, die generalisierte, tumor- und cystenbildende, hyperostotisch-porotische Form meines Wissens beim Hund bisher noch nicht ganz einwandfrei festgestellt worden. Diese Tatsache verdient um so mehr Beachtung, als gerade diese Form sowohl beim Menschen als auch beim Tier recht häufig beobachtet wird.

Die Erforschung der Osteodystrophia fibrosa des Menschen ist in erster Linie verbunden mit dem Namen: FRIEDRICH v. RECKLINGHAUSEN. In seinem letzten Werk (1910) bezeichnet er die mit Tumoren und Cysten einhergehende Ostëitis deformans PAGET's mit Ostitis fibrosa und ordnet sie ein in seine Gruppe der hyperostotisch-metaplastischen Malacie.

Seitdem haben eine Reihe von Pathologen und Chirurgen sich eingehend mit dem Problem der Ostitis fibrosa des Menschen beschäftigt. Nach dem Vorschlag von MICULICZ, REHN und STENHOLM wird die Erkrankung heute „Osteodystrophia“ genannt. „Wir empfinden wohl als das Untreffende des Wortes Ostitis“, sagt CHRISTELLER (1926). Man rechnet heute nach CHRISTELLER die Osteodystrophia fibrosa als eine malacische Knochenkrankheit zu den metapoëtischen Erkrankungen. Man

unterscheidet darunter wieder zwei Hauptgruppen: 1. die porotischen und 2. die sklerotischen Formen. Die letzteren stellen die Ausheilungsformen der ersteren dar. Unter diesen beiden Hauptgruppen gibt es je wieder zwei Untergruppen, die mit dem Zusatz a) hyper-ostotisch oder b) hyp-ostotisch bezeichnet werden, je nachdem der Anbau oder Abbau überwiegt. Die Osteitis deformans PAGET's wäre demnach heute die adulte, hyperostotisch-porotische Form der Osteodystrophia fibrosa, die der Ostitis fibrosa (v. RECKLINGHAUSEN) dann gleichzusetzen wäre, wenn sie mit Tumoren- und Cystenbildung verbunden ist. Auch die juvenile, hyperostotisch-porotische Form der Osteodystrophia fibrosa, die als die pseudorachitische bezeichnet wird, kommt nach MICULICZ, FRANGENHEIM, HELLMER und HIRSCH beim Menschen vor.

Auch beim Tier ist in neuerer Zeit die tumor- und cystenbildende Form der Osteodystrophia fibrosa wiederholt beobachtet worden. Von E. REHN wurde zuerst der Nachweis erbracht, daß die Schnüffelkrankheit der Schweine der Osteodystrophia fibrosa zuzurechnen ist. Dieser Erkrankung in allen Einzelheiten gleichende Bilder wurden für die Ziege (ZOBEL, CHRISTELLER) und den Affen (CHRISTELLER) beschrieben und von CHRISTELLER in sein System der malacischen Knochenerkrankungen als tumor- und cystenbildende, hyperostotisch-porotische Formen eingeordnet. Über die bei der Schnüffelkrankheit an den Rumpf- und Extremitätenknochen auftretenden Veränderungen hat INGIER berichtet. Sie hat damit die Befunde REHN's erweitert, die nur am Schädel erhoben werden konnten. SCHMORL (1913) berichtet, daß bei der Schnüffelkrankheit zwar starke Veränderungen am Kopf, aber nur geringe an den Rumpf- und Extremitätenknochen zu finden waren. Das Vorkommen einer hyperostotischen Form wurde weiterhin von CHRISTELLER für das afrikanische Flußpferd und das Stachelschwein festgestellt. Auch die von FOX aus dem zoologischen Garten von Philadelphia mitgeteilten Fälle von Osteosarkom bei Isabellgazelle und Opossum sind nach CHRISTELLER der hyperostotisch-porotischen Form der Osteodystrophia fibrosa zuzuordnen. Beim Pferd ist das der Schnüffelkrankheit ähnelnde Bild der Frischkrankheit von JOST und DOR sowie von JOEST und ZUMPE als hyper- bzw. hyp-ostotisch-porotischen Form der Osteodystrophia zugehörig erkannt worden. Auch ein großer Teil der von PAEHR beschriebenen Epuliden der Pferde dürfte nach der heutigen Anschauung diesen Formenkreis gehören. Es stellt also im allgemeinen die tumor- und cystenbildende, hyperostotisch-porotische Form der Osteodystrophia fibrosa eine bei zahlreichen Tiergattungen — ebenso wie beim Menschen — typische und gut bekannte Knochenerkrankung dar.

Es erhebt sich die Frage: „Kommt diese Form der generalisierten Osteodystrophia fibrosa auch beim Hund vor?“ oder besser: „Ist ihr Vorkommen beim Hund bereits einwandfrei bewiesen?“

Eine Kritik der Literatur hierüber findet sich bei CHRISTELLER (1923).



Demnach sind die Angaben in den älteren Arbeiten (z. B. SCHÜTZ, 1861) so unklar und widersprechend, daß sie leider aus dem Kreis unsere Betrachtungen ausscheiden müssen. Doch dürfen die Arbeiten von WILLIES und ROSSKOPF in diesem Zusammenhange nicht übergangen werden. WILLIES beschreibt einen Hund, der die gleichen Veränderungen aufweist, wie die von ihm berichteten Fälle von Schnüffelkrankheit bei Schwein und Ziege. WILLIES hält die vorliegende Erkrankung aber für Rachitis. Ebenso veröffentlicht ROSSKOPF einen mit Tumoren und Cysten einhergehenden Fall eines 5½ Monate alten Hundes. Auch er kommt in Analogie zu dem von WILLIES mitgeteilten Fall beim Hund zu der Diagnose Rachitis. Schon v. RECKLINGHAUSEN und später CHRISTELLER haben erkannt, daß es sich bei den von WILLIES mitgeteilten Fällen — als auch bei dem Hund — gar nicht um Rachitis handelt, sondern höchst wahrscheinlich um Osteodystrophia fibrosa. Damit fiel dann auch der Analogieschluß ROSSKOPF's weg. CHRISTELLER sagt darüber zusammenfassend: „Der Fall WILLIES' bedarf hiernach keiner näheren Kennzeichnung. Da die Beschreibung, die WILLIES gibt, für alle seine Fälle gemeinsam gilt, so gilt das, was er, wie wir anführten, für die Schweine Schädel angab, in gleicher Weise für den Schädel des Hundes. Der Fall ist von größter Bedeutung, denn er ist der einzige einwandfrei, wenn auch von seinem Verfasser verkannte Fall tumorförmiger Ostitis fibrosa des Gesichtsschädels beim Hunde.“ Auf Grund des Analogieschlusses von WILLIES, der noch dazu zum falschen Ergebnis führt, ist CHRISTELLER überzeugt, daß die tumorförmige, hyperostotisch-porotische Form beim Hunde vorkommt. Er führt sie daher in seinem Referat 192 mit an. Die Arbeit WILLIES' in Verbindung mit der Kritik CHRISTELLER läßt also die Vermutung begründet erscheinen, daß auch das Knochensystem des Hundes an einer solchen Form erkranken kann. Die einzige Arbeit jüngeren Datums über Ostitis fibrosa beim Hund — außer der eingangs genannten — ist meines Wissens die Dissertation von HAGER (1919). Sie ist CHRISTELLER offenbar entgangen. HAGER beschreibt eine Ostitis fibrosa bei einem Vorstehhund, bei dem sich mächtige Auswüchse am Ober- und Unterkiefer fanden. Diese Arbeit ist mir leider nur im Referat zugänglich. Da damals (1919) die Klassifikation CHRISTELLER's noch nicht bestand, dürfte es schwer sein, diesen Fall ohne Untersuchung der Originalpräparate, nachträglich in das System einzureihen. Immerhin muß, um einen Prioritätsstreit zu vermeiden, darauf hingewiesen werden, daß die Möglichkeit besteht, daß HAGER eine solche Form, die der Schnüffelkrankheit gleicht, bereits beschrieben hat. FRÖHNER berichtet 1895 über Epulis sarcomatosa bei einem 3- und einem 4-jährigen Mops. Im ganzen fand er diese Bildung bei 8 Hunden. Es ist auf Grund unserer heutigen Anschauung wohl möglich, daß auch diese Fälle der Osteodystrophia fibrosa zugezählt werden müssen. In übrigen scheint sich leider die Kenntnis von der Osteodystrophia fibrosa

in den Lehrbüchern der Veterinärmedizin nur langsam durchzusetzen, wie das auch ARNDT (1923) schon betont hat. So handeln HUTYRA und MAREK (1926) die zur Osteodystrophia fibrosa gehörige Schnüffelkrankheit der Schweine noch immer unter dem Kapitel Rachitis ab. Die neueste Auflage des Lehrbuches von KITT liegt mir leider nicht vor, doch spricht er 1910 noch von rachitischem Wucherungsgewebe, während ein m. E. typischer Fall von Osteodystrophia fibrosa am Hundeschädel abgebildet ist (KITT: 1910, S. 366, Fig. 187). Auch FRÖHNER und ZWICK stellen 1915 noch die zur Osteodystrophia fibrosa gehörige Schnüffelkrankheit und Kleiekrankheit unter dem Kapitel Rachitis dar.

JOEST bildet in seinem Handbuch (1926, Bd. 1, S. 111) den Schädel eines Hundes mit Ostitis fibrosa ab. Ob dabei außerdem eine generalisierte Form vorgelegen hat, ist nicht ersichtlich. Auf S. 116 (ebenda) ist der Kopf einer Bulldogge abgebildet mit der Diagnose „Spindellzellensarkom des Zahnfleisches“. Gerade diese Feststellung ist in Anbetracht der Epulisfrage von Bedeutung. Eine weitere Klärung dieser Verhältnisse erscheint wünschenswert. Die bei JOEST zitierte Arbeit von W. MEYER „Über die Epulis bei unseren Haustieren“ war mir leider nicht zugänglich.

Ein anderer, offenbar von KITT eingeführter Ausdruck, der in diesem Zusammenhang erwähnt werden muß, ist „der Ostitismus universalis“ der Hunde. Nach KITT, MÜLLER, GLASS ist er bei Hunden recht häufig. Diese Erkrankung befällt vorwiegend die Muskelansätze. Enorme Schwellung des Kopfes und des Unterkiefers wurde beobachtet. Auch HILL berichtet unter „Periostitis“, daß sich zwischen Knochen und Periost eine Ablage von knochenartiger Substanz fand, die später zu einer dauernden Exostose führte. Sie wurde von ihm beim Hunde besonders im Gebiet des alveolo-dentalen Periostes gesehen. Die Prozesse sind dort oft so bedeutend, daß stärkste Beschwerden entstehen. Diese sog. „Periostitis“ soll oft durch Trauma verursacht werden. Als ein weiteres Beispiel des sog. Ostitismus universalis wurde in neuester Zeit von HEBRANT, ANTOINE und LIEGEOIS die sog. „Ostéo-artropathie hypertrophiante“ beim Hunde beschrieben, bei welcher Verdickungen und periostale Auflagerungen entstanden. Es scheint also, daß mit dem Ausdruck Ostitismus universalis eine Reihe ganz verschiedener Krankheiten bezeichnet werden, die man zu klassifizieren bisher nicht unternehmen hat. CHRISTELLER sagt bei der Besprechung der Angaben KITTS über den Ostitismus universalis: „Es scheint mir beim Fehlen histologischer Angaben mehr als fraglich, ob hier eine Ostitis fibrosa vorliegt, aber es wäre wünschenswert, wenn man diesen Punkt an geeignetem Material studieren würde“.

Im folgenden soll versucht werden, den Nachweis zu erbringen, daß eine juvenile, tumor- und cystenbildende, hyperostotisch-porotische Form der Osteodystrophia fibrosa beim Hunde tatsächlich vorkommt. Ich

glaube, damit die berechtigte Vermutung CHRISTELLER's vollauf bestätigen zu können.

Die vorliegenden Beobachtungen wurden an einem 8½ Monate alten weiblichen Mops (Bostonterrier) erhoben (Abb. 1, sitzendes Tier). Da die Erkrankung das gesamte Skelettsystem befallen hat und an den Kiefern eine Tumor- und Cystenbildung beobachtet wurde, so stellt dieser Fall zugleich einen Beitrag dar zur Frage der genetischen Beziehungen der sog. „Epulis“ zur Osteodystrophia fibrosa.

## A. Bericht über den eigenen am Bostonterrier beobachteten Fall.

### I. Die Familien- und Krankengeschichte.

Nach Angaben der Besitzerin ist aus der Familien- und Krankengeschichte folgendes hervorzuheben:

Der Vater dieses Tieres erzeugte mit dem Muttertier der Mutter einen Wurf von 9 Jungen, die längere Zeit nach der Geburt angingen, „wie blind“ herum zu laufen, wobei sie gegen die Tische und Stühle stießen. Nach einiger Zeit gingen alle — einschließlich des Muttertieres — unter „Anfällen“ zugrunde. Eine Tochter dieses Muttertieres aus einem früheren Wurf, jedoch von demselben Vater, ist die Mutter zu vorliegendem Fall (Abb. 1, stehend). Sie warf 1925 5 Junge, 1926 wieder 5, von denen aus unbekannter Ursache 4 starben. Kurz vor dem Partus 1927 soll sie von einem Tisch gestürzt sein und sich dabei verletzt haben. Einige Tage darauf, am 2. Mai 1927, warf sie 3 Junge. Das eine wurde totgeboren, ein zweites starb 3 Tage nach der Geburt und ein drittes blieb zu-



Abb. 1.

Bostonterrier mit pseudotumor- und cystenbildender, juveniler, hyperostotisch-porotischer Form der Osteodystrophia fibrosa (sitzend) einige Wochen vor dem Tode. Verbiegung der Vorderbeine. Daneben das gesunde Muttertier (stehend).

nächst am Leben und stellt den vorliegenden besonderen Fall dar. Dieses Tier gedieh zuerst prächtig und wurde wegen seiner Schnelligkeit „Blitz“ genannt. Nach Ende der Stillperiode wurde es ausschließlich mit Spratt's „Fibo“ ernährt. Es wurde weder Fleisch, Brot, Kartoffeln noch Lebertran gefüttert. Als Getränk wurde regelmäßig Tee mit Milch verabreicht. Die Besitzerin berichtet ausdrücklich, daß sie ihre Tiere immer in dieser Weise aufgezogen hat und stets gute (? Verf.) Erfolge erzielte. Von einer Unterernährung könne jedenfalls keine Rede sein.

Im November 1927 — im Alter von 6 Monaten — erkrankte das Tier plötzlich an einer akuten Magen- und Darmstörung, die mit heftigem Erbrechen verbunden war. Am nächsten Morgen konnte es nicht mehr stehen und lag „wie gelähmt“. Außerdem begann sich die Nase mehr und mehr zu verstopfen. Das Tier fing an zu schnüffeln. Im Dezember konnte es überhaupt nicht mehr durch die Nase atmen. Die Luft entwich unter lautem Prusten zwischen den Lippen. Zur selben Zeit vermochte es keine harte Nahrung mehr zu sich zu nehmen. Der Hundekuchen mußte daher in Suppe



aufgeweicht werden. Am 16. I. 1928 stellten sich nachmittags um 5 Uhr und abends um 9,30 Uhr zum erstenmal „Anfälle“ ein, bei denen das Tier anscheinend bewußtlos dalag. Da diese „fits“ sich am nächsten Tage zu wiederholen drohten, wurde es mit Chloroform getötet.

2 Tage später wurde mir das Tier mit der Diagnose „Osteomalacie“ zur Sektion übergeben <sup>1)</sup>.

## II. Der allgemeine Status.

Es handelt sich um einen kräftigen, sogar etwas fetten Mops. Mit unbewaffnetem Auge sind an den inneren Organen keinerlei pathologische Veränderungen wahrzunehmen. Auf histologische Einzelbefunde an den Organen soll weiter unten näher eingegangen werden. Das Hauptaugenmerk richtete sich entsprechend der Diagnose „Osteomalacie“ naturgemäß auf das Knochen-system.

## III. Das Knochensystem.

### a) Makroskopischer Befund.

#### 1. Schädel.

##### α) Kiefer.

Bei der Betrachtung des enthäuteten Gesichtsschädels von vorn ist eine eigenartig übertriebene Bullenbeißerphysiognomie auffallend, die durch eine



Abb. 2.

tumorartige Vorwölbung des linken Oberkiefers. Ansicht des enthäuteten Gesichtsschädels.

Asymmetrie des Gesichtes noch gesteigert ist. Der Oberkiefer der linken Seite zeigt nach der buccalen Seite hin eine Vorwölbung, die, von vorn nach hinten ansteigend, im Bereich des 3. Prämolaren ihren Höhepunkt erreicht (Abb. 2). Die Höhe der Vorwölbung würde etwa die Dicke einer

<sup>1)</sup> Die Überlassung des Falles verdanke ich dem Tierarzt Herrn Dr. med. vet. H. SEARLS und Herrn Dr. med. PHILIP K. BROWN, Chef der medizinischen Abteilung des Southern Pacific Hospitals, San Francisco.



längsdurchschnittenen Dattel entsprechen, die mit der Schnittfläche auf die Außenseite eines normalen Kiefers aufgelegt wäre. Bei der Betrachtung dieses linken Oberkiefers von der Gaumenseite her (Abb. 3) zeigt sich, daß der 1. und 3. Prämolare nach innen gedrückt sind (siehe auch SPRING).



Abb. 3.

Tumorartige Vorwölbung des Oberkiefers und Stellanomalie der Zähne. Ansicht des linken Gaumens von unten.

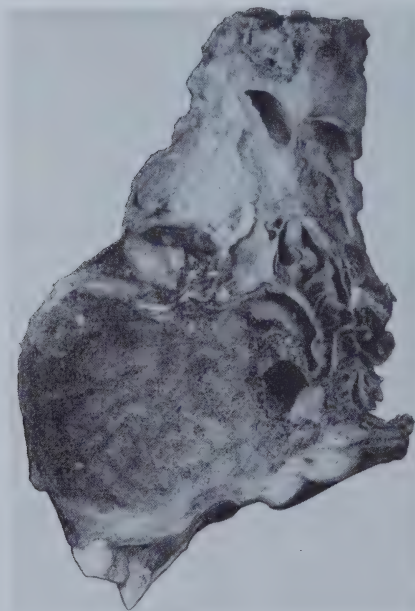


Abb. 4.

Pseudotumor („brauner Tumor“, intra-ossöse Epulis) des Oberkiefers. Schnitt- richtung senkrecht zur Tangentialebene des 4. linken Prämolaren. Schalenartige Schichtung durch fünf sichelförmige etwa parallel zur Oberfläche verlaufende Linien.

Bei der Zerlegung des Schädels zur histologischen Untersuchung fällt auf, mit welcher Leichtigkeit sich besonders der linke Oberkiefer zersägen läßt. Die Auftreibung in der Gegend des 3. und 4. Prämolaren kann sogar ohne Schwierigkeit mit dem Messer zerschnitten werden. Die Schnittfläche dieser Stelle des Oberkiefers (Abb. 4) ist von brauner Farbe. Auffallend ist eine fast konzentrische Reihe von etwa 5 sichelartigen Linien kleiner Hohlräume, die im allgemeinen parallel der Oberfläche verlaufen und die Schnittfläche bis zur Kieferhöhle durchziehen. Durch diese Linien wird das gesamte Territorium in halbmondförmige Abschnitte zerlegt. Das vorliegende Gewebe ist von derber, fibromähnlicher Festigkeit. Schon mit bloßem Auge erkennt man deutlich, daß sich die braune Gewebsmasse zwischen den Alveolarknochen des Oberkiefers und den Zähnen einerseits, zwischen Nasenraum, Kieferhöhle, Gaumendach und der Außenseite andererseits gleichmäßig ausbreitet.

Weitere Schnitte durch den Oberkiefer ergeben gemeinsam im Grund-

Daselbe Bild, das sich nur durch die weit geringere Ausdehnung der Gewebswucherung auszeichnet. Am rechten Oberkiefer findet sich zwischen dem Eckzahn und dem 3. Prämolaren nach außen zu eine stärkere Anhäufung der Gewebsmassen, die hier mehr grau erscheinen. Im Inneren, über dem Dach des harten Gaumens, sind zahlreiche größere und kleinere Cysten von Erbsengröße gelegen.

Die Schnittflächen durch verschiedene Stellen des Unterkiefers zeigen ebenfalls Verdickungen des Knochens, doch sind sie nicht so hochgradig wie die des Oberkiefers. Auch wurden cystische Hohlräume nicht gefunden.

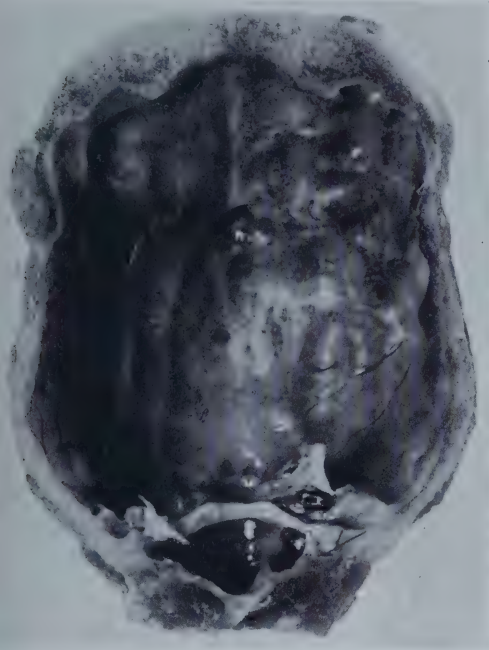


Abb. 5.

Verdickung und Auflockerung des Schädeldaches, besonders an der Stirn. Tabula externa und interna nicht unterscheidbar.



Abb. 6.

Leichte Verbiegung der Ulna, Auftreibung am distalen Ende. Oberfläche makroskopisch unverändert.

Zusammenfassend ergibt sich eine Auftreibung des Ober- und Unterkiefers durch Wucherung eines braunen, schneidbaren Gewebes, das von Cysten durchsetzt ist.

### β) Schädeldach.

Neben der diffusen Auftreibung der Kiefer findet sich eine Verdickung des Schädeldaches (Abb. 5). Besonders an der Stirn oberhalb der Augenhöhlen ist diese Verdickung ausgesprochen. Sie beträgt dort etwa 1 cm. Außerdem ist die verdickte Schädelkapsel zu einer bimssteinartigen Masse aufgelockert, so daß die Tabula externa von der interna nicht mehr unterschieden werden kann.

## 2. Extremitäten.

Die Vorder- und Hinterbeine sind leicht verbogen. Diese Verbiegung ist an den Unterarmen besonders ausgesprochen (Abb. 1). Am distalen Radius-, Ulna- und Tibiaende ist außerdem noch das Gelenkende in der Gegend einer erhaltenen knorpeligen Epiphysenplatte aufgetrieben. Die Verdickung ist am distalen Ende der Ulna nach Entfernung der Weichteile besonders gut zu sehen (Abb. 6). Im übrigen sind die Extremitätenknochen von normaler Härte und Schwere und makroskopisch sonst unverändert.

## 3. Rumpfknochen.

Die Knorpelknochengrenze der Rippen zeigt von außen gesehen makroskopisch keine Veränderungen. Ein Rosenkranz ist nicht vorhanden. A

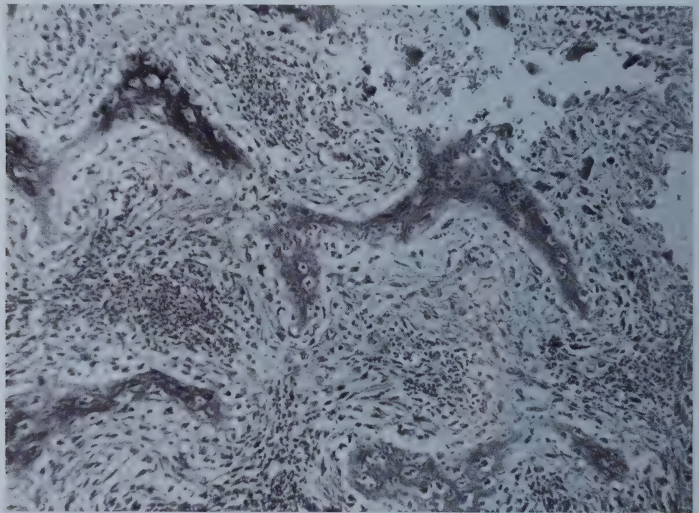


Abb. 7.

Typisches Bild der Osteodystrophia fibrosa: Riesenzellen, fibröses Mark, fibroblastische z. T. noch osteoide Knochenneubildung. Probeexzision aus der tumorförmigen Auftreibung hinter dem 1. und 2. rechten, oberen Molaren. Gefrierschnitt (Pr. 550). H.-E., Leica. Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.

dem Längsschnitt kann man unter einer dünnen, erhaltenen Epiphysenplatte, die zur Bildung einer geraden und regelmäßigen Epiphysenlinie führt, eine schmale, etwa 1 mm breite, enchondrale Zone von grauweißer Farbe unterscheiden. Das knöcherne Becken, das Schulterblatt und die Wirbelknochen weisen, mit bloßem Auge betrachtet, keinen besonderen Befund auf, doch sind sie weich und mit dem Messer schneidbar.

## b) Mikroskopischer Befund.

### 1. Schädel.

#### a) Kiefer.

Untersuchung eines Probestückes aus der Gegend hinter dem 1. und 2. rechten, oberen Molaren. Um für die Entkalkung und histologische Untersuchung des Gesamtskeletts eine Richtlinie zu



winnen, wurde aus der fibromähnlichen, derben Gewebsmasse hinter dem 1. und 2. rechten, oberen Molaren ein Stückchen entnommen und im Gefrierschnitt untersucht. Da durch die Untersuchung dieses Präparates das Wesen der vorliegenden Erkrankung bereits festgestellt werden konnte, soll der Befund, der daran erhoben wurde, hier besonders aufgeführt werden (Abb. 7).

Mit schwächster Vergrößerung schon sind an dem Probestück nach Hämatoxylin-Eosinfärbung 3 verschiedene Zonen zu unterscheiden:

Die erste Zone setzt sich zusammen aus einer dichten, verfilzten Gewebsmasse, die aus langen, spindeligen Zellen verschiedener Form und Länge besteht. Lange Zellen mit blassem Plasma und langem, blassem Kern und dickem, dunklem Nucleolus wechseln ab mit mehr plumpen Zellen mit rundlichem, blasigem Kern mit zartem Protoplasmanetz und zartem Kernkörperchen. Vereinzelt finden sich auch Rundzellen vor, die teils von beträchtlicher Größe, teils jedoch sehr klein sind. Die Frage, ob es sich dabei um Myelocyten oder Lymphocyten handelt, wird weiter unten besprochen; sie ist nach DOWNEY an Schnitten überhaupt nicht zu entscheiden. Zwischen dieses straffe Fibroblastengewebe eingestreut finden sich massenhaft rote Blutkörperchen, die meist außerhalb von Gefäßen liegend zu sinusartigen Seen sich vereinigen.

Das gesamte Gewebe der ersten Zone gleicht einem Fibrom, ohne die ungeheure Vielheit und Unreife der Zellformen aufzuweisen, wie etwa das Fibrosarkom.

Die zweite Zone ist ein Gebiet von Knochenneubildung. Der Aufbau ist ein stets in derselben Weise wiederkehrender und typischer. Netzförmige Knochenbälkchen werden von einem jungen Bindegewebe umhüllt und schließen zwischen sich sinusartige Blutseen. Das ganze Gewebe hat eine gewisse Ähnlichkeit mit Milzgewebe. Man könnte die Knochenspangen mit den Trabekeln und die Blutseen mit den Sinus der Milz vergleichen. Eine nähere Besprechung dieser Verhältnisse erfolgt in einem späteren Abschnitt.

Die Entstehungsweise der Knochenspangen läßt sich an verschiedenen Stadien deutlich verfolgen (Abb. 8). Die Zellen des Fibroblastengewebes rücken auseinander. Der Raum zwischen ihnen füllt sich mit einer zuerst hyalinartigen, eosinroten Intercellularsubstanz. Dabei ist deutlich zu beobachten, daß nicht nur Fasern des Bindegewebes und dessen Zellen umschlossen werden, sondern auch rote Blutkörperchen in großer Zahl. In

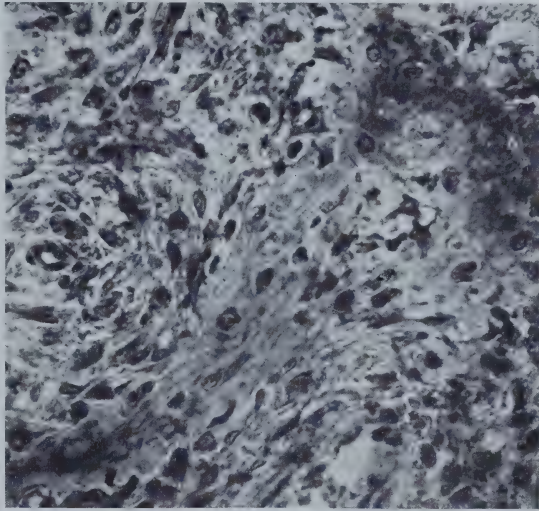


Abb. 8.

Der Modus der fibroblastischen Knochenbildung („Kernbildung“): Vermehrung und anschließende Verkalkung der Intercellularsubstanz zwischen den Zellen. Keine Osteoblasten in epithelartiger Reihe. Aus dem Präparat der Abb. 7. Stärkere Vergrößerung. Leitz: Apochr. 4 mm, Proj. Ok. II.



höheren Stadien verkalkt die Intercellularsubstanz durch Einlagerung von Krümeln und Körnchen (Konkremente, LANGENSKIÖLD). Die Substanz färbt sich dann mit Hämatoxylin blau. Irgendwelche Zeichen von lamellöser oder Schalenknochenbildung finden sich nicht. Der vorliegende Prozeß muß als eine Verkalkung von Bindegewebe oder als eine fibroblastische Knochenbildung aufgefaßt werden (WEIDENREICH). Die eosinroten, unverkalkten Gebiete wären demnach fibroblastisches Osteoid, die verkalkten hingegen fibroblastischer Bindegewebsknochen oder besser Faserknochen.

Auf diese Knochenspangen folgt ein lockeres Bindegewebe. Das besondere Aussehen der Zellen, ihre lockere, myxoidale Lagerung erinnert an ein aktives Endost oder allgemein an ein mesenchymales, embryonales Bindegewebe.

Diese Schicht geht ohne scharfen Übergang und ohne besondere Endothelabgrenzung in die nächste über, in der allmählich der Reichtum an roten Blutkörperchen zunimmt und die Anzahl der Fasern des Bindegewebes abnimmt. Schließlich kommt es in der Mitte zwischen den von lockerem Gewebe umgebenen Knochenspangen zur Bildung von sinusartigen, blutgefüllten Räumen.

Die dritte Zone soll als die der Resorption bezeichnet werden. Sie ist schon — wie eingangs erwähnt — mit bloßem Auge als eine Art von Perforationslinie erkennbar, die quer durch das Präparat hindurchläuft. Hohlraum folgt auf Hohlraum; nur kleine Zwischenstücke verbinden die beiden Seiten des Präparates. An den Wänden der Hohlräume, an den Zwischenstücken und an den Knochenspangen liegen zahlreiche Riesenzellen. Diese gehören zum syncytialen Typ. Sie sind nicht ringsherum scharf begrenzt wie etwa die Riesenzellen des Tuberkels. Sie gehen vielmehr nach einer Seite zu, oft ganz allmählich, in das umliegende Gewebe über (s. RITTER). Ihr Plasma ist basophil. Die Anzahl der Kerne schwankt zwischen 2, 20 und mehr. An einzelnen Stellen scheinen die Riesenzellen mit ihrem Protoplasma nach Art von Amöben freie Bindegewebszellen oder Blutkörperchen zu umschließen und in ihren Leib aufzunehmen. Die Anordnung der Kerne innerhalb der Riesenzellen ist sehr wechselnd. Auch die Struktur der einzelnen Kerne ist verschieden. Meist ist kein besonderes Kernkörperchen oder etwa ein Plasmanetz in ihnen erkennbar. Die Mehrzahl der Kerne ist von einer Masse kleinster, unregelmäßiger, rundlicher Körnchen erfüllt. Es handelt sich dabei wohl um einen degenerativen Vorgang, um eine Zerkümmerung und Vernichtung anscheinend vorher aufgenommener Zellen (LANGENSKIÖLD). Daß es sich um Aufnahme ganzer Zellen handelt und nicht um Zelltrümmer, glaube ich daraus schließen zu dürfen, daß die Kerne und Kerntrümmer gegen das dunkle, basophile Plasma der Riesenzelle durch einen hellen Hof abgesetzt sind, den ich für das Plasma der eingeschlossenen Zelle halten möchte. Aus der Lagerung der Riesenzellen in passender Buchten kann auf eine lebhaftere Resorptionstätigkeit geschlossen werden, die sich sowohl auf das fibromähnliche Gewebe, als auch auf die neugebildeten Knochenspangen erstreckt. Sehr bemerkenswert ist, daß der neugebildete Faserknochen auf der einen Seite noch im osteoiden Vorstadium sich befindet, während er auf der anderen Seite abgebaut wird.

Über die Gefäßversorgung ist zu sagen, daß in allen 3 Zonen arterielle Gefäße nur selten zu sehen sind. Gewöhnlich sind sie von präkapillarer Größe. Die Wandung ist dann zumeist hyalin verdickt. Es finden sich mehr rote Blutkörperchen außerhalb der Gefäßwandungen als innerhalb. Gefäßsprosse und Kapillaren sind jedoch sehr zahlreich. Die Sinus weisen nur ganz vereinzelt eine endotheliale Auskleidung auf.

Räumlich wäre das Gewebe etwa mit einem Schwamm zu vergleichen, der sich voll Blut gesogen hat. Daher ist es auch verständlich, daß die drei soeben beschriebenen Zonen nicht regelmäßig in der Ebene aufeinander folgen, sondern sich im Raum einander durchkreuzen.

Eine Zusammenfassung der Befunde an dem probeweise entfernten Stück ergibt also: Im Raum durchflochten sind 3 Prozesse: 1. fibromartige Gewebsneubildung; 2. fibroblastische Faserknochenneubildung mit z. T. noch osteoider, z. T. bereits verkalkter, manchmal konkrementartiger Grundsubstanz, umgeben von lockerem, undifferenziertem Keimgewebe und sinusartigen Blutansammlungen; 3. zu Hohlräumen führende Resorption des neugebildeten Knochens und des Bindegewebes durch massenhafte, vielkernige, syncytiale Riesenzellen.

Die Diagnose lautet: Osteodystrophia fibrosa des Oberkiefers. Ein solcher Befund wurde beim Menschen für den Unterkiefer neben anderen Autoren auch von GOHDE beschrieben, und die dazu von BERBLINGER gegebene Bemerkung könnte ohne Einschränkung auch auf den vorliegenden Fall übertragen werden: „Es handelt sich um eine Epulis mit Annäherung an die sog. Riesenzellenepulis, eine Bildung, die man nach den neueren Forschungen als eine lokalisierte Form der Ostitis fibrosa auffassen muß“.

Es liegt der Verdacht vor, daß es sich nicht allein um eine lokale Erkrankung der Kiefer handelt, sondern im Hinblick auf die klinische Diagnose Osteomalacie gleichzeitig um eine allgemeine Osteodystrophia fibrosa des ganzen Skeletts. Es wurden daher die übrigen Knochen (mit Ausnahme der Kiefer) nach POMMER unvollständig entkalkt, um über die Verhältnisse der Kalkverteilung Aufschluß zu gewinnen und um mit Hilfe der Thionin-Pikrinsäuremethode nach SCHMORL etwa vorhandene osteoide Säume einwandfrei nachweisen zu können.

Gebiet des vierten linken, oberen Prämolaren. Diese Gegend erweist sich makroskopisch am stärksten verändert (Abb. 4). Die mikroskopische Untersuchung zeigt, daß sich dort im wesentlichen die gleichen histologischen Vorgänge abspielen, wie in dem soeben beschriebenen probe-



Abb. 9.

Osteodystrophia fibrosa des Oberkiefers (sog. intra-ossöse Epulis) im Gebiet des 4. linken, oberen Prämolaren. Ausbreitung des Pseudotumors zwischen Zahn und Oberkiefer. Über dem Gaumendach fibromähnliche Gewebswucherung (Hamartoplasie). Zahlreiche Cysten. Außerdem geringe Faserknochenneubildung am Periost unter der Umschlagsfalte der buccalen Schleimhaut. Parlodionsschnitt (Pr. 567), H.-E., Leitz: Mikrosommar 24.

weise entnommenen Gewebstück der rechten Seite. Eine Betrachtung bei schwacher Vergrößerung gibt Aufschluß über die Ausbreitung und die räumlichen Beziehungen (Abb. 9). Der Alveolarknochen des Oberkiefers bildet die obere Begrenzung. Nach unten zu folgt der Nerv. Das ganze übrige Gewebe unterhalb des Nerven und um den Zahn selbst entspricht in allen Einzelheiten dem eingangs beschriebenen Stück. Abb. 9 läßt — wenn auch nur undeutlich — erkennen, daß zwischen dem Zahn und der Nasenhöhle über dem Gaumendach ein besonderes Gebiet sich abhebt. Die nähere Untersuchung ergibt, daß es sich hier um ein Gewebe handelt, das man kurz als „fibromähnlich“ bezeichnen könnte. Zwischen dem Nerv und diesem „Fibrom“ finden sich zahlreiche, rundliche Hohlräume, die mit Blutkörperchen gefüllt sind. Eine endotheliale Auskleidung ist vielfach vorhanden. Außerdem sind



Abb. 10.

Massenhafte Cysten in der Auftreibung des Oberkiefers. Schnitt senkrecht zur Tangentialebene des 2. linken, oberen Prämolaren. Parolodionschnitt (Pr. 565), H.-E., Leitz: Mikrosommar 24.

in dem Präparat einige sichelartige Perforationslinien zu erkennen, die dem Ganzen schon makroskopisch ein eigenartiges Gepräge geben. Diese Linien werden durch Hohlräume gebildet, die durch Zwischenstücke unterteilt sind und an ihren Wänden Riesenzellen in großer Zahl aufweisen. Nach außen zu von der Zahnwurzel, ebenso nach oben und innen, ist immer wieder dasselbe Bild zu beobachten: Spangen neugebildeten Faserknochens, lockeres Bindegewebe und Blutseen.

Wo normalerweise der Alveolarknochen liegt, findet sich ein schwammartiges Gewebe neugebildeten, z. T. osteoiden, z. T. bereits verkalkten Faserknochens. Dieses ist den SHARPEY'schen Fasern, die die Zähne halten, entsprechend längsfaserig ausgerichtet. Zwischen dem längsfaserigen Osteoid liegen zahlreiche Blutkörperchen in einer Anordnung, die ebenfalls der Richtung der SHARPEY'schen Fasern folgt.

Von einer ursprünglichen Zahnalveole oder einem Alveolarfortsatz kann nicht mehr gesprochen werden. Der einzige Rest von

ehemaligem Kieferknochen liegt über dem Nerven. Er enthält z. T. Fettmark, z. T. ein zartes Gerüstmark. Nach oben zu, unter der Umschlagsfalte der buccalen Schleimhaut, ist eine geringe Neubildung von Faserknochen unter dem Periost zu beobachten.

Zweiter linker, oberer Prämolar. Ein Sagittalschnitt durch das Parodontium vor und hinter dem zweiten linken, oberen Prämolaren liefert ein Präparat, das zahlreiche Cysten enthält. Schon mit unbewaffnetem Auge sind an dem 20  $\mu$  dicken Schnitt etwa 90 größere und kleinere Cysten sichtbar (Abb. 10). Die größte Cyste liegt neben der Zahnwurzel über dem Gaumendach. Ihr Inhalt ist z. T. ausgefallen.

Die hier erwähnten Cysten sind von besonderer Bedeutung für die Osteodystrophia fibrosa. Deshalb soll ein eingehender Befund angeschlossen werden:

Die Cysten sind wahllos in dem schwammigen Gewebe zerstreut, das in derselben Weise wie das Stück der Probeexzision zusammengesetzt ist. Ihr



Wandungen sind sehr verschiedenartig: Häufig sind sie ringsherum von einer einreihigen Zelllage in Form eines flachen, zusammenhängenden Endothels ausgekleidet. Oft wird diese Auskleidung jedoch unvermittelt von einer Knochenspange unterbrochen. Mitunter fehlt hingegen ein Endothel teilweise oder sogar vollständig, dann bildet das Bindegewebe der Umgebung ihre Umgrenzung. Somit „erscheint“ ein großer Teil der Cysten im Schnitt geschlossen. Allerdings konnte ich verschiedentlich beobachten, daß eine Reihe von Cysten untereinander oder durch einen Gang mit dem Blutsinus in Verbindung stehen.

Abb. 11 zeigt, wie eine solche Cyste, die von Endothelzellen allein oder Endothel im Wechsel mit einer Knochenspange zu Dreiviertel ihres Umfanges ausgekleidet ist, plötzlich ihre Wandung verliert und sich mit dem restlichen Viertel frei in die Umgebung öffnet. Der Inhalt dieser Cysten wird von roten Blutkörperchen gebildet und von einer serumartigen Flüssigkeit, in der manchmal auch Riesenzellen zu sehen sind. Ein festes Gewebe ist im Cystenraum wohl nicht vorhanden oder nur in solchen Fällen, in denen das Blut organisiert ist. Der Cysteninhalt geht an den Öffnungen der Cysten ganz allmählich in das blutreiche und faserige Gewebe der Umgebung über.

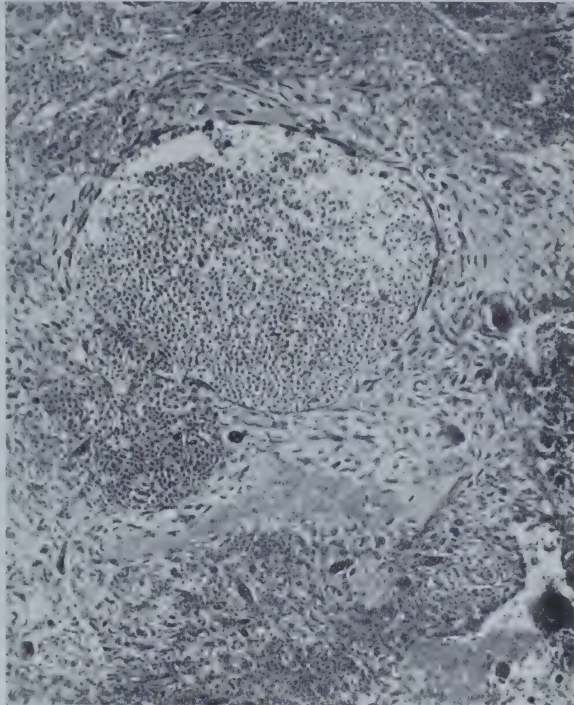


Abb. 11.

Eine Cyste aus dem Präparat der Abb. 10 bei stärkerer Vergrößerung. Die Wandauskleidung bestehend z. T. aus Endothel, z. T. aus Knochen. Öffnung der Cyste in die Umgebung bestehend aus Faserknochenneubildung, fibrösem Mark, Riesenzellen und Blutseen. Leitz: Apochr.

16 mm, Proj. Ok. II.

Linker, oberer Eckzahn. Die Umgebung des linken, oberen Eckzahns, besonders oberhalb des Gaumendachs, stellt einen besonders eigentümlichen Befund dar (Abb. 12).

Auf den Zahn selbst folgt zuerst ein Periodontium von normaler Breite. Daran schließt sich ein Alveolarknochen an, der vermutlich frisch entstanden ist. Es handelt sich z. T. um osteoide Knochenbalken, die in der Verlaufsrichtung der SHARPEY'schen Fasern, die den Zahn halten, angeordnet sind. Als nächste Schicht folgt eine Reihe von Riesenzellen, die den neugebildeten Alveolarknochen wieder zerstören. Die Riesenzellen grenzen ein Gewebe ab, das, oberhalb des Gaumendaches liegend, die mannigfachsten Zellformen aufweist. Das Ganze stellt ein Gebiet von Knochenneubildung dar. Das um die



Knochenspangen liegende Markgewebe besteht aus Fettmark, Fasermark und einem zarten Reticulum mit feinsten, sternförmigen Mutterzellen. Eingelagert darin sind massenhaft rote Blutkörperchen, Plasmazellen mit typischem Radspeichenkern, Lymphocyten und myeloide Elemente (Abb. 13). Gefäße sind vorhanden. Ihre Wandungen sind fast durchweg hyalin verdickt. Sehr zahlreich sind Gefäßsprosse. Auch histiocytäre Elemente finden sich in großer Anzahl. Darin eingeschlossen sind Pigmentkörnchen, Kerntrümmer und Vakuolen. Durch alle diese verschiedenartigen Bestandteile ist das Bild außerordentlich unruhig und wechselnd.

Um darzulegen, daß auch der Unterkiefer in gleichem Sinne erkrankt ist, wird ein Querschnitt aus der Gegend des 1., 2. und 3. rechten, unteren



Abb. 12.

Osteodystrophia fibrosa, Pseudotumor und Cysten um den linken, oberen Eckzahn. Parlodionschnitt (Pr. 563), H.-E., Leitz: Mikrosommar 24.

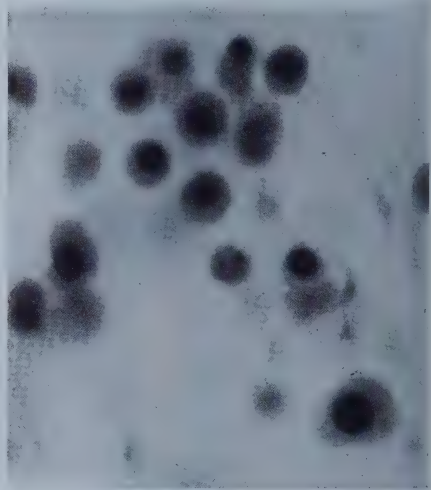


Abb. 13.

Myeloide Elemente aus dem hell erscheinenden Mark des Alveolarknochens über dem Gaumendach. Parlodionschnitt (Pr. 568), H.-E., Leitz: Apochr. Ölimmers. 3 mm, Periplan. Ok. 8, Kameralänge 80 cm. Vergr. 1730:1.

Schneidezahns wiedergegeben (Abb. 14). Auch hier findet sich das eingangs beschriebene Gewebe in der gleichen Weise, so daß auf eine Wiederholung der Beschreibung verzichtet werden kann. Alle Schnitte durch den zerlegten Unterkiefer ergeben Knochenneubildung, Fasermark und Riesenzellen. Im allgemeinen sind die Veränderungen am Unterkiefer aber nicht so stark wie am Oberkiefer.

Besondere Befunde an den Zähnen selbst. An den einzelnen Zähnen selbst finden sich einige Veränderungen, die besonders abgehandelt werden sollen. Die Verhältnisse im Paradentium wurden z. T. schon geschildert. Demnach ist der Knochen der Alveolarfortsätze ersetzt durch ein teils verkalktes, teils osteoides, neugebildetes Knochengewebe. Die Höhe dieses Knochengewebes, das den Alveolarknochen vertritt, liegt etwas tiefer, als es normalerweise der Fall ist. Die Kuppe dieses Alveolarfortsatzes ist

„ausgefranst“, d. h. das Bindegewebe geht ganz allmählich in das Knochengewebe über. Darüber findet sich ein kernarmes, straffes Bindegewebe. Unter dem Epithel liegen vereinzelte, rundzellige Infiltrate. Ein Epitheltiefenwachstum konnte an keinem der untersuchten Präparate festgestellt werden. Am Zement wurden keine besonderen Veränderungen beobachtet. Er findet sich in mächtiger Ausdehnung um die Wurzel. Im Foramen apicale des linken, oberen Eckzahns liegt eine Zementneubildung, die sich nach dem Pulparaum faserig aufsplittert. Das Zahnbein selbst zeigt starke Verkalkungsstörungen, die in Form von blaugefärbten, kugelförmigen Gebilden mit dazwischen liegenden zackigen rosa-gefärbten Räumen in Erscheinung

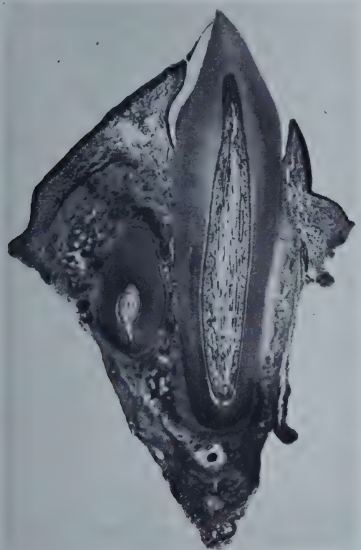


Abb. 14.  
Osteodystrophia fibrosa des Unterkiefers. Makroskopisch keine Veränderungen. Schnitt aus der Gegend des 1. bis 3. rechten, unteren Schneidezahns. Parlodionschnitt (Pr. 543 A), H.-E., Leitz: Mikrosommar 24.

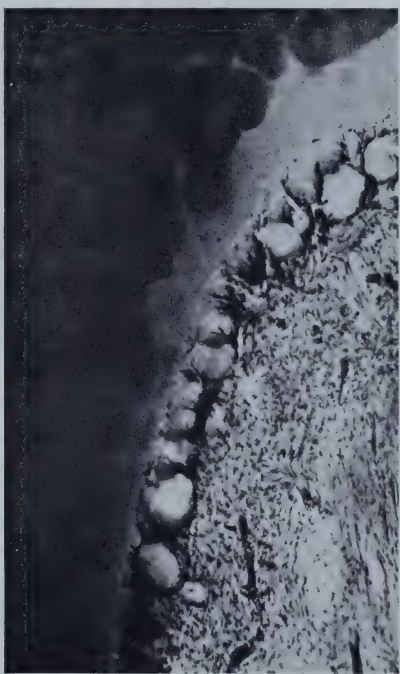


Abb. 15.  
Verkalkungsstörungen im Dentin, Hyperämie der Pulpa. Degeneration der Odontoblasten. Linker, oberer Eckzahn. Parlodionschnitt (Pr. 565), H.-E., Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.

treten (Abb. 15). Die Wandung der Pulpahöhle besteht aus einer sehr breiten Schicht typischen Prädentins. Die Gefäße der Pulpahöhle sind stark gefüllt. Vereinzelt finden sich Blutungen. Das Pulpagewebe ist auffällig locker. Es enthält zahlreiche Hohlräume, die mit einer zart-blauen Masse gefüllt sind. Die Odontoblastenschicht zeigt starke Abweichungen von der Norm. An einigen Stellen — besonders am 2. linken, oberen Prämolaren — sind die Odontoblasten ganz geschwunden und durch eine Kette großer, klarer Alveolen ersetzt. Die Septen zwischen den Alveolen haben ihren Halt mit den Fortsätzen der Dentinkanälchen bewahrt. An anderer Stelle, so im 2. linken, oberen Schneidezahn, finden sich herdförmige Blutungen in der Odontoblastenschicht, die dort aus unregelmäßigen, verschiedenartigen blassen und hellen, länglichen Zellen besteht (Abb. 16). Die Blutkörperchen liegen um die

Zellen herum. Die Dentinkanälchen der dazu gehörigen Gebiete sind ein kleines Stück weit mit einer dunkelroten Masse gefüllt. Es ist möglich, daß es sich um Eintritt von Blutfarbstoff oder auch von erhaltenen Blutkörperchen in die Dentinkanälchen handelt.

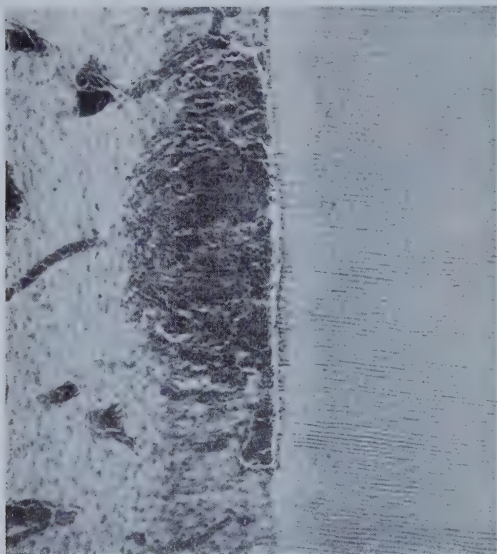


Abb. 16.

Blutungen in der Odontoblastenschicht. Blutfarbstoff (?) in den Dentinkanälchen. Zweiter linker, oberer Schneidezahn. Parlodionschnitt (Pr. 562), H.-E., Leitz: Apoehr. 16 mm. Proj. Ok. II.

Zusammenfassend ergibt sich also für den Befund an den Zähnen selbst: Schwere Verkalkungsstörungen im Dentin; Hyperämie der Pulpa und Degeneration der Odontoblasten; herdförmige Blutungen in der Odontoblastenschicht.

### β) Schädeldach.

Die histologische Untersuchung des am stärksten verdickten und aufgelockerten Teils des Schädeldaches (Abb. 5) ergibt, daß das Mark im äußeren Drittel der Gesamtdicke in ein straffes Fasergewebe umgewandelt ist. Durch osteoklastische Resorptionsvorgänge ist die ehemalige Tabula externa sowohl von außen als auch von innen angegriffen (Abb. 17). An einigen Stellen ist die Oberfläche vollständig zerstört, so daß man nur mit

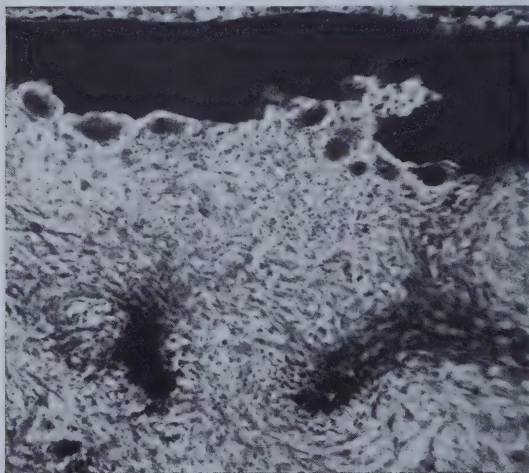


Abb. 17.

Lakunäre Resorption der Tabula externa des Schädeldaches von innen. Fibröses Mark. Inseln von fibroblastisch neugebildetem Knochen. Parlodionschnitt (Pr. 559), H.-E., Leitz: Apoehr. 16 mm, Proj. Ok. II.

Mühe die äußere Abgrenzung verfolgen kann. Immerhin ist eine Reihe von Trümmern stehen geblieben, die eine Resorption nach der Innenseite, aber nicht nach dem Periost zu, aufweisen. Unter der oberflächlichen Lage von Trümmern oder Resten der alten Rinde finden sich ausgedehnte fibröse Räume, in denen Inseln von neugebildeter Knochensubstanz gelegen sind. Daß es sich hier nicht um Reste alten Spongiosaknochens handelt, zeigt die SCHMORL-Färbung. Die Knochenkörperchen in diesen Inseln erscheinen nicht als längliche Gebilde mit zierlichen Ausläufern, wie in den Trümmern alter Knochen; sie haben vielmehr eine plumpe, wanzenförmige Gestalt.



artige Form mit dicken, kurzen Ausläufern, die mit Hilfe der Thionin-Pikrinsäuremethode nur schwer zur Darstellung gebracht werden können. Im Hämatoxylin-Eosin-Präparat ist ersichtlich, daß die Bindegewebsfasern des fibrösen Marks von allen Seiten her in die Inseln mit verdichteter Interzellularsubstanz einstrahlen. Besondere knochenbildende Elemente, etwa in Form von epithelartig angeordneten Osteoblasten, werden in der Umgebung nicht erblickt. Es handelt sich somit um Verkalkung (Verknöcherung) von Bindegewebe, einen Vorgang, der heute als fibroblastische Knochenbildung bezeichnet wird (CHRISTELLER, WEIDENREICH). Die Markräume der übrigen zwei Drittel der Rindendicke führen ein normales Fett- und Lymphmark. Die Knochenbälkchen in diesen Gebieten tragen schmale, osteoide Säume (Abb. 18).

Zusammenfassend ergibt sich also folgender Befund am Schädeldach: Lakunäre Resorption der Tabula externa von innen und außen durch Tätigkeit von Riesenzellen; Fasermark im äußeren Drittel der Rinde mit Inseln fibroblastischen Osteoids und Faserknochenneubildung.

### γ) Warzenfortsatz.

Die knöcherne Labyrinthkapsel und die ihr unmittelbar angrenzenden Knochen — besonders der Warzenfortsatz — zeigen im allgemeinen die gleichen Veränderungen, wie sie am Schädeldach beobachtet wurden. Besonders sind hier die Stellen der Sehnenansätze befallen. Der

Warzenfortsatz ist dort von außen her durch die Tätigkeit von Riesenzellen ausgehöhlt, ohne daß allerdings die Sehnenansätze ihren Halt verloren hätten. Der entstandene Raum ist mit fibrösem Mark erfüllt (Abb. 19). Innerhalb dieses Markgewebes hat eine ausgedehnte Bildung von präkollagener Substanz stattgefunden, die in Form von eosinroten Inseln in Erscheinung tritt. In die Inseln sind in fortgeschrittenen Stadien blaue, krümelige Massen eingelagert. Es handelt sich also auch hier um eine Verkalkung oder Verknöcherung von Bindegewebe.

Neben diesen einwandfrei von außen vorrückenden Herden konnte auch im Innern des Knochens das Auftreten von Riesenzellen, fibrösem Mark und fibroblastischer Knochenneubildung beobachtet werden (Abb. 20). Im Knochen-

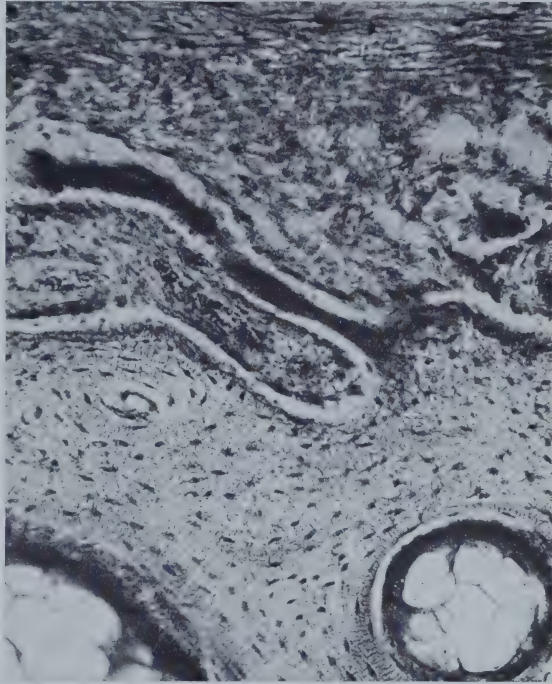


Abb. 18.

Lakunäre Resorption der Tabula externa des Schädeldaches von außen. Fibröses Gewebe zwischen längsfaserigem Periost und Knochen. Faserknochenneubildung mit osteoiden Säumen. Fettmark im Innern. Schmale, osteoide Säume am lamellösen Knochen. Parlodionschnitt (Pr. 561), Thionin-Pikrinsäure (SCHMORL), Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.



gerüst der Cellulae pneumaticae ist ein Spongiosabalken in der Längsrichtung ausgehöhlt und mit fibrösem Mark gefüllt (Abb. 21). In diesem fibrösen Markraum sind Riesenzellen zu sehen und an einigen Stellen ebenfalls Inseln von fibroblastischer Knochenneubildung. Die Begrenzung des im Schnitt wie „zerteilt“ erscheinenden Knochenbalkens nach dem fibrösen Mark zu ist buchtig und verrät deutlich, daß eine osteoklastische Tätigkeit für die Aus-  
 höhlung des Balkens verantwortlich gemacht werden muß. Die noch be-

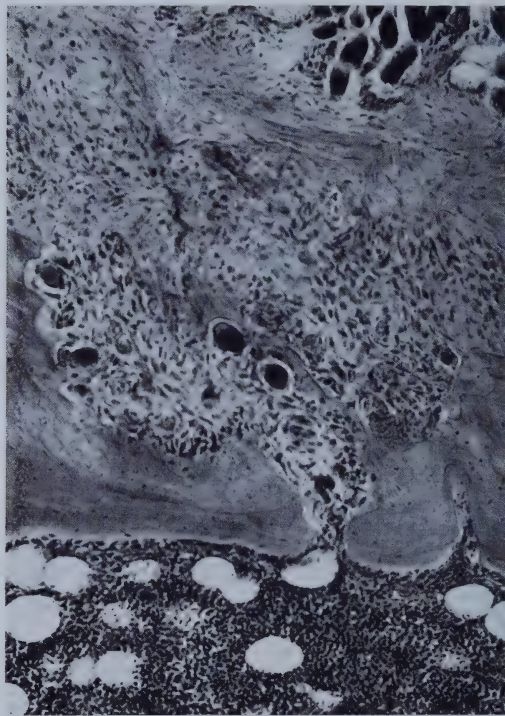


Abb. 19.  
 Herdförmige Osteodystrophia fibrosa des rechten Warzenfortsatzes am Periost unter einem Muskelansatz. Riesenzellen von außen her wirkend, fibröses Mark, Inseln von neugebildetem Faserknochen. (Pr. 545/29), H.-E., Leitz: Apoehr. 16 mm, Proj. Ok. II.

stehende Schale des Knochens selbst zeigt zahlreiche Kittlinien, so daß auf einen vermehrten An- und Abbau in wechselnden Etappen geschlossen werden kann. Die Außenseite des Balkens ist glatt. Sie ist von Osteoblasten bedeckt. Das Mark der Umgebung besteht vorwiegend aus Fett- und Lymphmark. Die Frage, ob das fibröse Markgewebe vom Endost oder Periost her stammt, läßt sich nur bedingt beantworten, denn alle diese Bilder stellen einen augenblicklichen Zustand dar, dessen Bewegungsrichtung nur mit Wahrscheinlichkeit aus den Bildern abgelesen werden kann. Durch einen schmalen Knochenkanal besteht eine direkte Verbindung zwischen dem fibrösen Fasermark im Innern und dem Fett- und dem Lymphmark der Umgebung. Andererseits steht das fibröse Mark im Innern des Spongiosabalkens in unmittelbarer Verbindung mit einem Herd, der unterhalb des Periostes an einem Sehnenansatz entstanden ist.

Außer diesen in Kürze aufgeführten Befunden zeigt das Felsenbein selbst eine Reihe

anderer pathologischer Verhältnisse. Da die vorliegenden Veränderungen an der knöchernen Labyrinthkapsel für die Frage der Otoklerose von Bedeutung sind (NAGER, BRUNNER, O. MAYER), so ist beabsichtigt, sie in einer besonderen Abhandlung — vermutlich in: „Archives of Otolaryngology, 1929“ — darzustellen und ihre Bedeutung für das Otokleroseproblem zu erörtern.

## 2. Extremitäten.

### a) Humerus.

Ein Längsschnitt durch die proximale Epiphyse des Humerus bei schwacher (Abb. 22) und besonders bei stärkerer (Abb. 23) Vergrößerung betrachtet, läßt erkennen, daß 5 verschiedene Zonen unterschieden werden

können: Die eigentliche Epiphyse, eine superchondrale Zone, die knorpelige Epiphysenplatte, eine subchondrale Zone und das Knochenmark.

Die Befundaufnahme soll begonnen werden mit der Untersuchung der Epiphysenplatte. Sie erscheint im frischen Präparat mit unbewaffnetem Auge als ein gleichmäßiges, etwa 1 mm breites, glasiges, sanft gebogenes Band. Nach Hämatoxylin-Eosin-Färbung und bei mittlerer Vergrößerung betrachtet sind folgende Einzelheiten zu bemerken: Die Zone des ruhenden Knorpels ist nur 2—3 Knorpelzellen stark. Die weiter distal folgende Säulenschicht ist zwar im ganzen ziemlich regelmäßig gebaut, doch zeigen sich bei stärkerer Vergrößerung einige Abweichungen von der Norm. Die Knorpelzellen liegen nicht in geraden Säulen; sie sind vielmehr durch Züge von blaß-blau gefärbter Knorpelsubstanz auseinandergedrängt. Dadurch kommt es zur Bildung von Abteilungen, die sich nach dem distalen Ende hin erweitern oder verengern. In den erweiterten Teilen liegen mehrere Knorpelzellen unruhig nebeneinander. Die ganze Säulenschicht ist etwa 30—40 Knorpelzellen dick. Die Zellen selbst haben meist eine abgeplattete Form. Im mittleren Drittel der Säulenschicht sind die Knorpelzellen etwas dunkler gefärbt. Als Gesamtwirkung ergibt sich daraus ein schmales, dunkles Band, das die ganze, sonst blasse Epiphysenlinie der Länge nach senkrecht zu den Säulen in der Mitte durchzieht. Die sich an den Säulenknorpel

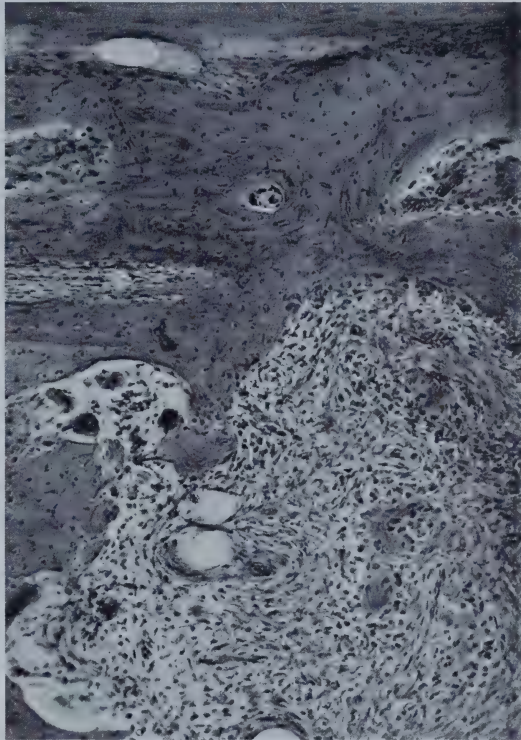


Abb. 20.

Herdförmige Osteodystrophia fibrosa des Warzenfortsatzes. Riesenzellen von innen her wirkend. Fibröses Mark. Inseln fibroblastischer Knochenneubildung. Parlodionschnitt (Pr. 545/13), H.-E., Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.

anschließende Verkalkungs- und Eröffnungszone bietet keine Besonderheiten. Nach dem Hämatoxylin-Eosin-Präparat zu urteilen, ist die Verkalkung ungestört und gleichmäßig. Auch die Eröffnung ist im wesentlichen regelmäßig, wenn auch einzelne Inseln mit säulenartig angeordneten Knorpelzellen, von verkalkter Knorpelgrundsubstanz umgeben, erhalten sind.

Die distal folgende subchondrale Zone weist starke Veränderungen auf. Sie stellt eine schon mit unbewaffnetem Auge am frischen Präparat sichtbare weiße Linie dar, die etwa doppelt so dick ist wie die Epiphysenlinie. Schon bei schwacher Vergrößerung wird offenbar, daß es sich um ein schwammartiges Gerüst von neugebildetem Knochen handelt. Bei starker Vergrößerung sieht man unzählige kurze, mehr oder weniger zusammenhängende



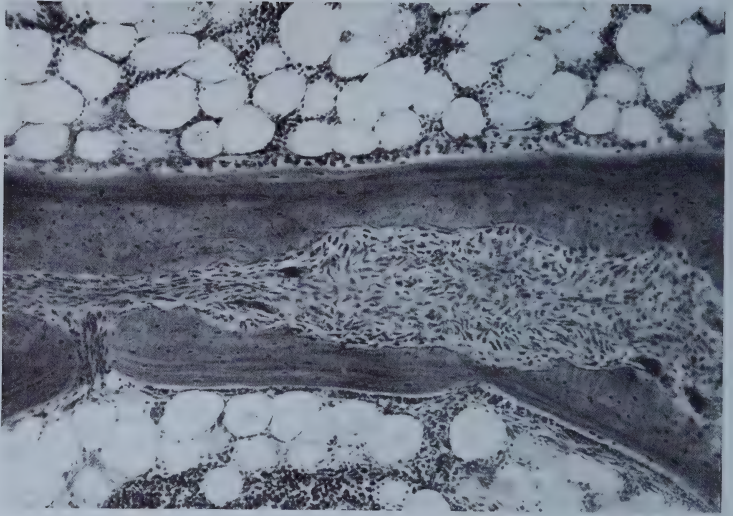


Abb. 21.

Dissezierende Atrophie (L. Pick). Aufspaltung eines Spongiosabalkens aus der Warzenfortsatz. Fibröses Mark, Riesenzellen. Kanal zum unveränderten Fett- und Lymphmark. Parlodionschnitt (Pr. 545/29), H.-E., Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. D



Abb. 22.

Längsschnitt durch die proximale Epiphyse des rechten Humerus mit den fünf Zonen: 1. Eigentliche Epiphyse, 2. superchondrale Zone, 3. knorpelige Epiphysenplatte, 4. subchondrale Zone und 5. Lymphmark. Auflockerung der Rinde. Parlodionschnitt (Pr. 532), H.-E., Leitz: Mikrosommar 24.

Knocheninseln. Diese Knocheninseln bieten im Hinblick auf ihren histologischen Entwicklungszustand die mannigfachsten Bilder dar: Einige weisen in ihrer Knochensubstanz zackig Kittlinien auf, die auf vermehrten An- und Abbau schließen lassen. Anderen tragen osteoide Säume, die sich besonders im SCHMORL-Präparat leuchtend gelb gegen den braunen Grund des übrigen Knochens abheben. Die Knochenkörperchen in den braunen Gebieten kommen trefflich zur Darstellung, nicht aber in den hellgelben osteoiden Säumen. An anderer Stelle liegen vereinzelt reihenweise Osteoblasten an den Knochenbalken. Ganz besonders stark sind die Resorptionsvorgänge. Bei zehnfacher Vergrößerung ist eine große Zahl von Riesenzellen in einem Gesichtsfeld sichtbar. Es handelt sich um Zellen des syncytialen Typs mit zahlreichen Kernen und blauem Plasma, das oft unscharf in das Markgewebe übergeht. Daß diese Riesenzellen als Osteoklasten wirksam sind, geht aus den zahlreichen Lakunen hervor, die an den entsprechenden Stellen in der

Knochensubstanz vorhanden sind. Doch finden sich auch Buchten im Knochen, die keine Riesenzellen enthalten. Der Knochen sieht dann wie „ausgenagt“ aus. Seine Grundsubstanz zeigt am Rande dieser Höhlungen eine starke Blaufärbung, die sich nach dem Knochen zu allmählich verliert und nicht durch eine Kittlinie gegen den nicht blaugefärbten Teil abgesetzt ist. In diese Buchten findet eine Ablagerung von zart-rosa gefärbter, osteoider Substanz statt, die im SCHMORL-Präparat hellgelb erscheint, während der Rand der Buchten schwarz bis dunkelbraun ist. Zwischen der osteoiden Substanz und dem Knochen ist also eine scharfe Grenze. Es ist daher wohl nicht angängig, die osteoide Zone etwa durch Halisterese zu erklären. In diesem Falle dürften — im Sinne von MOLINEUS — die osteoiden Zonen durch Anlagerung von unverkalkter Knochensubstanz entstanden sein. Man kann jedenfalls nicht den Nachweis einer Kalkberaubung erbringen. Das Bild läßt sich vergleichen mit einer Felsenküste, deren vom Meer ausgebrochene Buchten mit losem Schwemmsand wieder gefüllt sind.

Das Mark der subchondralen Zone besteht aus einem blutgefäßreichen, lockeren Fasergerüst, in das neben vereinzelten Lymphocyten und zahlreichen roten Blutkörperchen vor allem myeloide Elemente eingelagert sind. Auch Riesenzellen liegen frei in diesem Gerüstmark, ohne daß eine unmittelbare Beziehung zu den Knocheninseln festzustellen wäre.

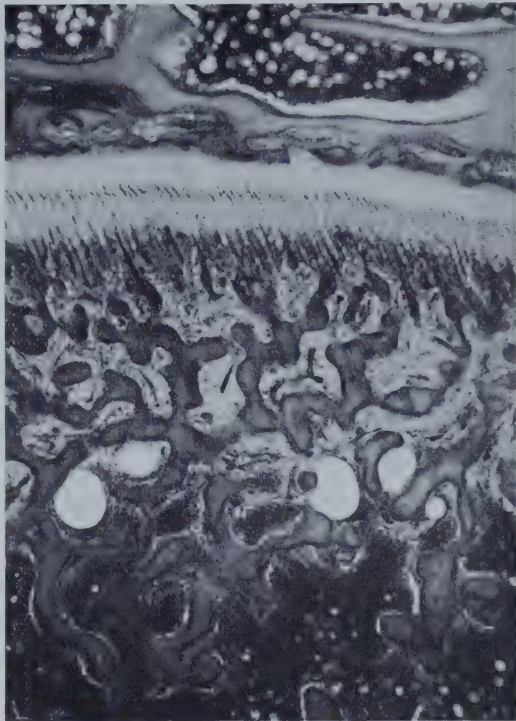


Abb. 23.

Dasselbe Präparat wie Abb. 22. Stärkere Vergrößerung. Die knorpelige Epiphysenplatte und die beiden oberhalb und unterhalb davon gelegenen Zonen mit typischer Osteodystrophia fibrosa. (Vgl. CHRISTELLER: 1923, S. 58, Fig. 8), Leitz: Obj. 1, Proj. Ok. II.

Die Entstehung der Knocheninseln läßt sich aus den einzelnen Stadien, in denen die Entwicklung vorgefunden wird, rückläufig verfolgen. In dem der Eröffnungszone nächstliegenden Gebiet findet die Ablagerung des Knochens auf die Reste des verkalkten Knorpels statt, in denen manchmal noch wohlausgebildete Knorpelzellen liegen. Weiter distal, im Zentrum der subchondralen Zone, kann von einer Ablagerung von Knochen auf einen vorher gebildeten oder stehengebliebenen „Kern“ nichts mehr festgestellt werden. Dort entsteht der Knochen vielmehr ohne Grundlage in fibroblastischer Weise, durch direkte Verkalkung von Bindegewebsfasern des faserigen Marks. Das vermehrte Auftreten von Intercellularsubstanz ist wohl der erste Schritt. Sie färbt sich rot mit Eosin nach Art einer hyalinen Substanz. Aus dem zarten Fasermark strahlen in den so entstandenen „Kern“



feinste Bindegewebsbündel ein, was besonders prächtig im VAN GIESON-Präparat zu erkennen ist. Ob die Matrixzellen des Bindegewebes dabei aktiv mitwirken, läßt sich aus dem morphologischen Bild nicht sagen. Es finden sich jedenfalls keine Reihen von knochenbildenden Zellen wie am lamellösen Knochen. Das verkalkte Bindegewebe muß daher als neugebildeter Faserknochen angesprochen werden und seine Vorstufe als fibroblastisches Osteoid.

Auf die subchondrale Zone folgt ein normales Lymphmark, das stellenweise von Fettzellen durchsetzt ist. Die Knochenbalken der Spongiosa zeigen schmale, osteoide Säume, die von dem eigentlichen Knochen meist durch eine Art Kittlinie getrennt sind. Riesenzellen sind nur ganz vereinzelt an den Balken der Spongiosa zu sehen.

In der Epiphyse, unmittelbar oberhalb der Epiphysenplatte, ist ein schmaler Streifen sichtbar, der als „superchondrale Zone“ bezeichnet werden soll und etwa halb so breit ist wie die Epiphysenplatte. Die histologischen Einzelheiten dieser Schicht weichen in einigen Punkten von denen der subchondralen Zone ab und verdienen daher eine besondere Beschreibung. Auf der Epiphysenlinie liegt ein breiter Knochenbalken. Er grenzt die knorpelige Epiphysenplatte gegen die eigentliche Epiphyse ab. Dieser Knochenbalken ist nach der Epiphysenlinie zu ausgehöhlt. Die Buchten sind mit Fasermark erfüllt, das viel derber ist und dichter als in der subchondralen Zone. So kommt es, daß unmittelbar auf die Epiphysenplatte nach oben ein derbes, fibröses Mark folgt, das in die Schicht des ruhenden Knorpels einstrahlt. In den Buchten finden sich zahlreiche Riesenzellen, die sowohl nach dem Knorpel wie auch nach dem Knochenbalken zu gelegen sind und osteoklastische Tätigkeit ausüben. Im übrigen gleicht das Bild dem der subchondralen Zone: auch hier die osteoiden Säume, welche die Buchten füllen, und jene myeloiden Elemente. Gefäße sind hingegen nicht so zahlreich, auch Blutungen finden sich nicht. Wohl aber ist fibroblastische Knochenbildung vorhanden: Die von der ruhenden Knorpelschicht ausstrahlenden Bindegewebsbündel führen zwischen sich eine hyaline Grundsubstanz, die, an einigen Stellen verkalkt, zur Entstehung von Faserknochen geführt hat, meist aber im osteoiden Vorstadium stehengeblieben ist. Diese hyalinen Gebiete, die die erste Stufe der Faserknochenbildung darstellen, sind im allgemeinen sehr kernarm. Eine Umprägung von Knorpelzellen in Knochenzellen konnte ich nicht beobachten. Wohl aber ist ein Nebeneinander von Knorpelzellen und Bindegewebszellen in derselben hyalinen Grundsubstanz sichtbar (v. EBNER, BORST, LANG).

Das Epiphysengebiet des Caput humeri stellt im wesentlichen ein normales Spongiosawerk dar, das mit Lymphmark gefüllt ist. Die mit Fasermark gefüllten Buchten der über dem Epiphysenknorpel gelegenen Knochenplatte stehen an einigen Stellen mit dem Mark der eigentlichen Epiphyse in Verbindung. Am Gelenkknorpel finden sich keine Veränderungen, nur weist das Mark unmittelbar unterhalb des Gelenkknorpels einige faserreiche Gebiete mit ganz vereinzelt Riesenzellen auf.

Wenden wir uns der Rinde des Humerusschaftes zu: Schon mit bloßem Auge ist eine Auflockerung der Rinde deutlich erkennbar, besonders im lateralen Teil (Abb. 22). Hohlraum reiht sich an Hohlraum. Bei starker Vergrößerung ist ersichtlich, daß die Hohlräume durch lakunäre Resorption von HAVERS'schen Systemen aus entstanden sind. Massenhaft finden sich Riesenzellen in ihnen. Das Mark in den entstandenen HAVERS'schen Räumen ist von der gleichen Beschaffenheit wie in der subchondralen Zone. Im ganzen erscheint es heller und lockerer als das der großen Markhöhle. Die Zahl der undifferenzierten Zellen ist groß. Auch hier wieder finden sich zwischen den Bindegewebszellen der Matrix mit ihren klaren Kernen

und farblosem Plasma jene Zellen mit dunkelblauem Kern und basophilem Plasma, die ihrer Größe, Form und Färbbarkeit nach an Myelocyten erinnern.

Am großartigsten sind die Veränderungen unter dem Periost besonders an der Vorder- und Außenseite des Humerus. Es sei bei der Beschreibung dieser Veränderungen vom Knochen aus nach dem Periost vorgegangen: Einige der vorher erwähnten Hohlräume in der Rinde öffnen sich nach außen in das subperiostale Lager. Dadurch weist der Knochen, der makroskopisch glatt erscheint, mikroskopisch ein poröses Aussehen auf. Außerdem läßt sich feststellen, daß nicht alle Buchten von innen her entstanden sein können. Die gesamte Oberfläche des Knochens ist vielmehr auch von außen ausgegagt. Eine große Zahl von Riesenzellen bedeckt die äußere Oberfläche des Knochens und hat Buchten in die Rinde gegraben.

Sehr eigenartig ist, daß die Riesenzellen nicht unmittelbar unter dem Periost liegen, sondern daß zwischen dem faserigen, längsverlaufenden Periost und dem angenagten Knochen eine subperiostale Lage eines rosahyalinen, kernlosen Gewebes sich findet (Abb. 24). Diese hyalinen Gebiete treten an der gesamten Außenseite des Knochens in großen Inseln auf und werden unterbrochen von lockerem Bindegewebe und reichlichen Blutgefäßen. In der Umgebung der subchondralen Zone finden sich einige subperiostale Blutungen (Abb. 24). Die roten Blutkörperchen ordnen sich zwischen den auf Zug beanspruchten Bindegewebsfasern in parallelen Ketten an.

Mit den Resorptionsorganen an der Außenseite parallel geht ein lebhafter Anbau neuer

Knochensubstanz. Besonders an den nach SCHMORL gefärbten Präparaten kommen diese Verhältnisse klar zum Ausdruck (Abb. 25). Der ehemalige mellöse Knochen der Rinde ist gegen einen außen aufgesetzten Faserknochen durch eine scharfe Kittlinie abgesetzt. Die Buchten dieser Kittlinie liegen mit ihren Konkavitäten nach außen. In sie hinein ist der Faserknochen abgelagert. Sein Rand nach dem Periost zu ist ausgefranst. Gegendwelche Osteoblasten in Reihenform können nicht beobachtet werden (Abb. 26). Der neugebildete Knochen an dieser Stelle ist also durch direkte Verkalkung von Bindegewebe entstanden. Blutgefäße und Binde-

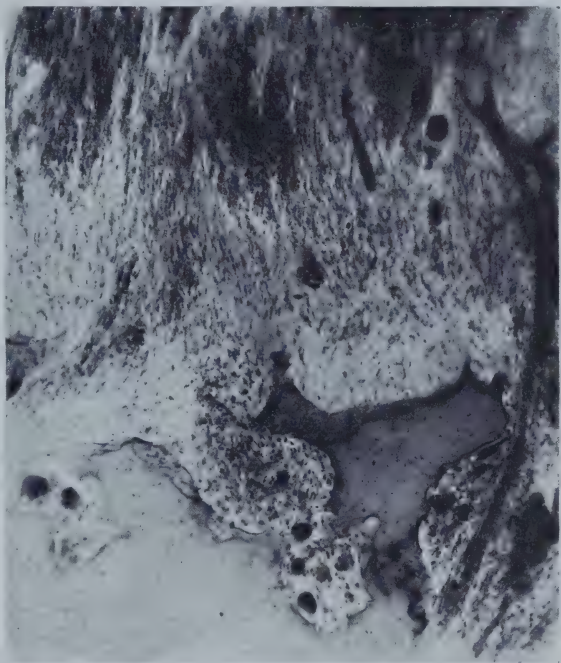


Abb. 24.

Dasselbe Präparat wie Abb. 22. Außenseite des Humerus an der konkaven, medialen Seite. Resorption des Knochens von außen. Subperiostale Blutungen. Kernarme Inseln dystrophischer Verkalkung. Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.



gewebe werden von dem neugebildeten Knochen umschlossen. Die Rände nach außen sind vielfach noch im osteoiden Vorstadium. Wir haben es also auch hier mit einem fibroblastischen Osteoid zu tun, das im SCHMORL Präparat leuchtend gelb erscheint. Auch die hyalinen Inseln färben sich mit der Thionin-Pikrinsäuremethode intensiv gelb. Zellen lassen sich in ihnen auch bei gut chromiertem Material nicht zur Darstellung bringen. Ich möchte diese Inseln für Gebiete dystrophischer Verkalkung ansehen. Sie verhalten sich ähnlich wie die osteoiden Zonen des neugebildeten Faserknochens.

Als zusammenfassender Befund für die Verhältnisse an der Rinde ergibt sich: Resorption von außen (Abb. 24); Ausfüllung der resorbierten Gebiet

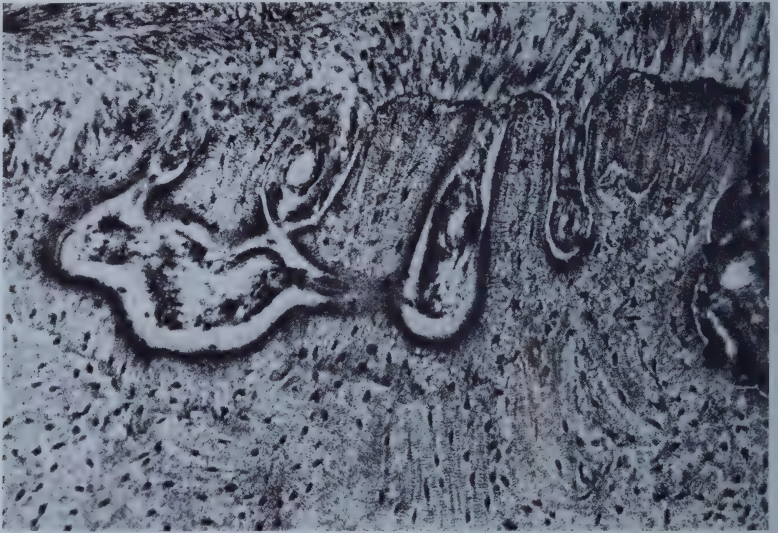


Abb. 25.

Hyperostotische Form der Osteodystrophia fibrosa. R. Humerus distal. Lakunäre Resorption des lamellösen Knochens von außen (im Bilde ganz rechts). Ausfüllung der Höhlungen mit nach dem Periost hin ausstrahlendem Faserknochen. Einschluß von Gefäßräumen, ausgekleidet von Osteoid. Kittlinie an der Grenze von neugebildetem Faserknochen und altem lamellösen Knochen (im unteren Drittel des Bildes) mit nach außen zu — im Bilde oben — sich öffnenden Buchten. Parlodionschnitt (Pr. 535).

Thionin-Pikrinsäure (SCHMORL), Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.

mit z. T. osteoidem, z. T. verkalktem Faserknochen (Abb. 25, 26); dystrophische Verkalkungsinselformen zwischen Rinde und Periost (Abb. 24); subperiostale Blutungen in Höhe der enchondralen Zone (Abb. 24).

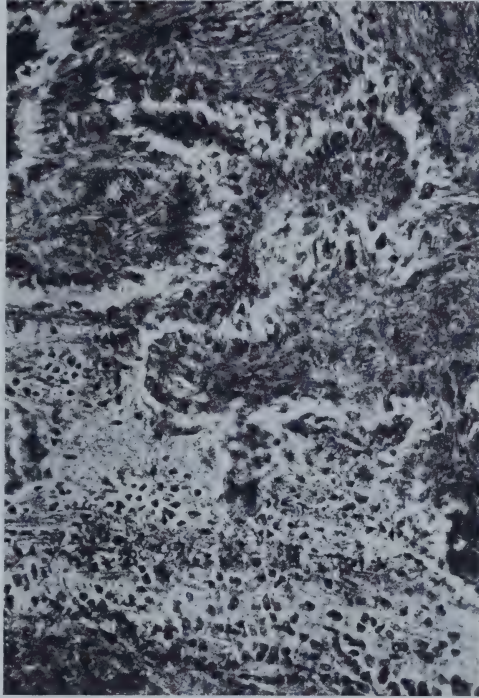
Das distale Humerusende zeigt dieselben Veränderungen an der Rinde wie der übrige Knochen. Die Hohlräume in der von außen resorbierten Corticalis sind von neuem, z. T. noch osteoidem Faserknochen ausgefüllt. Die Produktion dieser Neubildung überschreitet in ihrer Mächtigkeit an einigen Stellen die normale Konturlinie, so daß es zu einer leichten Verdickung des aufgelockerten Knochens kommt. In der Fossa olecrani hat die Zerstörung des lamellären Knochens und der Ersatz durch Faserknochen besonders hohe Grade erreicht. Nur ein schmaler Streifen alten Knochens ist stehen geblieben. Er wird gegen den neuentstandenen Faserknochen durch eine Kittlinie abgegrenzt, deren konkave Höhlungen in der Richtung

nach dem Faserknochen liegen. Ein gutes Stück weit ist der neugebildete Knochen bereits verkalkt. An der Grenze von verkalktem und unverkalktem Gewebe findet sich im verkalkten Teil eine Anschoppung von körnig-krümeliger, hämatoxylin-blauer Substanz (Abb. 27). In Gestalt einer blauen Welle bildet sie die Grenze gegenüber dem unverkalkten Bindegewebe, jedoch nicht in Form einer Kittlinie. Der verkalkte Teil stellt also möglicherweise keine neue Einheit dar, sondern dieselbe wie der unverkalkte Knochen, nur in einer anderen Zustandsform.

Die Trochlea führt Fettmark, ebenso das unterste Ende des Schaftes. Der Übergang zum Lymphmark findet ganz allmählich im unteren Drittel des Schaftes statt.

### β) Linker Radius, distal.

Die Untersuchung des distalen Radiusendes ergibt einen Befund, der dem am Humerus erhobenen so weitgehend gleicht, daß die dort gegebene Beschreibung ohne weiteres auf den Radius übernommen werden kann. Die Verdickung und Auftreibung der Rinde ist auch hier ausgesprochen, ebenso sind die Befunde an den knorpeligen Resten der Epiphysenlinie, sowie die Markverhältnisse die gleichen wie am Humerus.



### γ) Rechtes Femur.

Die Veränderungen am Femur weisen eine so große Ähnlichkeit mit denen des Humerus auf, daß von einer besonderen Beschreibung der Einzelheiten abgesehen werden kann. Die dem

Trochanter major entsprechende Epiphyse enthält eine knorpelige Platte, eine subchondrale und superchondrale Zone, deren Bau die gleichen Eigentümlichkeiten aufweist wie die des Humerus. Auch am Caput femoris finden sich die nämlichen Verhältnisse. Das System der Spongiosabalken ist plump. Die Rinde ist durch gerüstmarkhaltige Räume aufgelockert. An der Außenseite sind wieder jene kernarmen Inseln mit hyaliner Grundsubstanz vorhanden (Abb. 28). Auch die Resorptionslücken, mit den in sie hineingebauten Faserknochen, finden sich an der Außenseite genau wie am Humerus (Abb. 29). Subperiostale Blutungen sind vereinzelt zu sehen. Osteoide Säume werden im lamellosen Knochen, am ausgefranzten Ende des Faserknochens und als unmittelbare Umgrenzung der von außen angelegten Rinde beobachtet. Das Spongiosawerk im Innern weist osteoide Säume und vereinzelte Riesenzellen auf.

Abb. 26.

Fibroblastische Knochenneubildung unter dem Periost des rechten Humerus, distales Ende. Plumpe Knochenzellen. Z. T. osteoider, z. T. bereits verkalkter Faserknochen. Keine Osteoblasten in epithelartiger Reihe. Parlodionschnitt (Pr. 533), Thionin-Pikrinsäure (SCHMORL), Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.



## d) Linke Tibia, distal.

Die Beschreibung der histologischen Einzelheiten des Humerus kann auf die Tibia übernommen werden. Die Rinde der Tibia ist besonders distal noch etwas stärker aufgelockert als beim Humerus. Die Hohlräume in der Corticalis der Tibia sind von fibrösem Markgewebe erfüllt. Die subchondrale Zone gleicht völlig der des Humerus mit Gerüstmark, fibroblastischer Knochenneubildung und Resorptionsvorgängen. Die Hohlräume in dem Knochenbalken, der an den ruhenden Knorpel der Epiphysenplatte grenzt, sind von einem gleichmäßigen, dichten, fibrösen Markgewebe und von Riesenzellen eingenommen. Die Resorptionsprozesse sind von der Epiphysenseite her weit in den Knorpel vorgedrungen, so daß sich auch fibröse Markräume innerhalb des ruhenden Knorpels finden.



Abb. 27.

Ausfüllung der von außen her entstandenen Resorptionslücken unter dem Periost des rechten Humerus. Knochenneubildung mit körnig-krümeliger Zone. Nach außen schmales Osteoid. Keine Osteoblasten in Reihen. Parlodionschnitt (Pr. 533), H.-E., Leitz: Apochr. 4 mm, Proj. Ok. II.

## e) Drittes Metatarsale des rechten Fußes.

Der Befund am Mittel Fußknochen des rechten Fußes ist insofern von Bedeutung, als hier an der Außenseite der Rinde dieses kurzen Röhrenknochens nach vorhergehender Resorption ein Übermaß von Faserknochenbildung zustande gekommen ist. Der angelagerte Knochen zeigt in dem nach SCHMORL gefärbten Präparat besonders große und plumpe Knochenkörperchen. Eine Kittlinie trennt ihn vom alten, lamellenlösen Knochen, deren Konkavitäten nach außen liegen. Die Rinde ist aufgelockert. Die entstandenen Haversschen Räume werden von Gerüstmark und Riesenzellen

ingenommen. In den noch nicht zugebauten, von außen her entstandenen Buchten findet sich als Fortsetzung des Periostes ein straffes, fibröses Bindegewebe mit myeloiden Elementen und Riesenzellen. An einigen Stellen liegen in der Mitte dieses fibrösen Gewebes Inseln mit vermehrter Interzellularsubstanz, die als Vorstufe späterer Knochenentwicklung zu gelten haben. Das Mark im Innern ist Lymphmark. Die Spongiosabälkchen tragen schmale osteoide Säume.

## 3. Rumpfknochen.

## α) Vierte Rippe, links.

Die Knorpelknochengrenze der Rippen weist im Prinzip die gleichen Veränderungen auf, wie sie an der knorpeligen Epiphysenlinie der Röhrenknochen beobachtet wurden. Im ganzen verläuft die Knorpelknochengrenze gerade (Abb. 30). Der ruhende Knorpel zeigt ein normales Bild. Knorpelmarkkanäle sind nur vereinzelt zu sehen. In jedem Schnitt finden sich 3 kleine Gefäße, die aber nicht in „Etagen“ verlaufen, sondern in axialer Richtung. In gleicher Weise wird die Mitte der Epiphysenlinie durch ein größeres Gefäß unterbrochen. Der Säulenknorpel ist nicht gestört, nur eine ganz geringe Verschiebung der Säulen ist vorhanden, in ähnlicher Weise wie sie bereits beim Humerus beschrieben wurde. Die präparatorische Verkalkung ist — soweit die angewandten Färbungen eine Beurteilung gestatten — normal. In der Eröffnungszone dringen stark mit Blut gefüllte Kapillaren gegen die Knorpelzellen vor. Ferner ist eine subchondrale Zone von etwa 1 cm Länge nachweisbar. Sie ist gekennzeichnet durch ein faseriges Mark, das eine Mittelstellung zwischen Gerüstmark und fibrösem Mark einnimmt. An den Knochenbalken und frei im Mark liegen zahlreiche Riesenzellen. Deutlich ist ferner eine Knochenneubildung nach dem fibroblastischen Typ. Im SCHMORL-Präparat (Abb. 31) läßt sich feststellen, daß die Knochenkörperchen dieser faserknöchernen Gebiete außerordentlich unregelmäßig und plump sind und nicht in Reihen und Lamellen liegen. Die Anlagerung lamellosen Knochens ist stark eingeschränkt. Meist geht sie nur in Form von Osteoid vonstatten. Die Corticalis ist nach außen hin vollständig rarefiziert. Vereinzelt Trümmer des alten Knochens sind stehen geblieben. Daneben sind deutlich Inseln von neugebildetem Faserknochen vorhanden. Die Buchten des von außen angefrassenen Knochens sind z. T. mit Gerüstmark, z. T. mit fibrösem Mark erfüllt, das bis gerade an den großen Markraum heranreicht und an einzelnen Stellen sogar in das Mark vordringt. Dadurch kommt es zu einer Auflockerung der Rinde. Die JAVERS'schen Räume enthalten neben fibrösem Gewebe noch Riesenzellen,

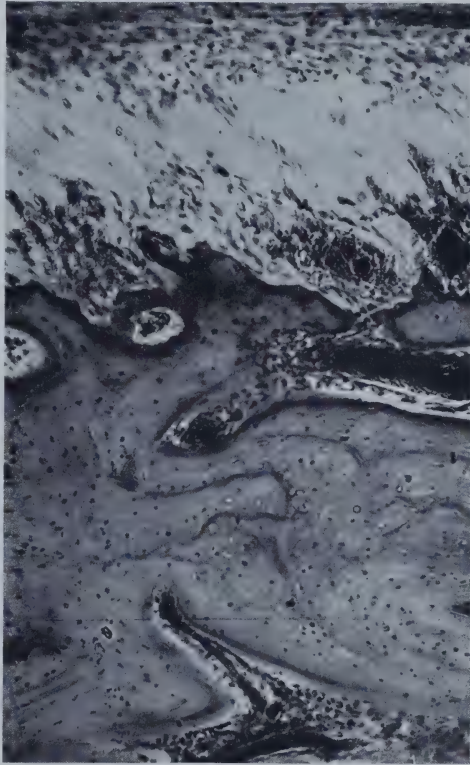


Abb. 28.

Außenseite des rechten Femur. Hyaline eosinrote kernarme Inseln dystrophischer Verkalkung (Hamartoplasie, „verpuffter Faserknochen“) zwischen Periost und angenagtem Knochen. Parlodionschnitt (Pr. 536), H.-E., Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.



Gefäße und myeloide Elemente. Der große Markraum selbst führt reines Lymphmark. Die Bälkchen tragen schmale, osteoide Säume und nur sehr vereinzelt einmal eine Riesenzelle.

### β) Rechte Scapula.

Die rechte Scapula weist Veränderungen auf, die den bereits an den Extremitätenknochen beschriebenen gleichen. Die Außenseite ist durch Buchten mit Riesenzellen und fibrösem Mark verändert. Besonders an den Ecken des

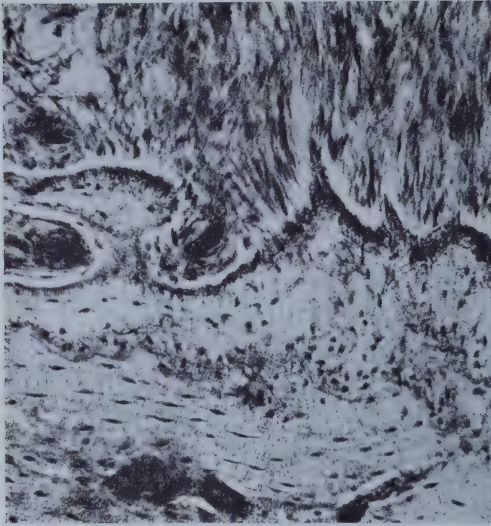


Abb. 29.

R. Femur, proximales Ende. Anlagerung von neugebildetem, nach dem Periost „ausgefranstem“ z. T. osteoidem Faserknochen. Deutlicher Unterschied zwischen diesem Faserknochen mit plumpen, unregelmäßig gelagerten Knochenkörperchen und dem alten lamellosen Knochen mit zierlichen, länglichen Körperchen. Kittlinie an der Grenze von altem und neuem Knochen mit offenen Buchten zur Neubildung. Parlodionschnitt (Pr. 536) Thionin-Pikrinsäure (SCHMORL), Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.



Abb. 30.

4. Rippe, links. Knorpelknochengrenze. Kein Rosenkranz. Subchondrale Zone mit Osteodystrophia fibrosa fast über das ganze Bild sich erstreckend bis zum Beginn des Lymphmarks. Parlodionschnitt (Pr. 529), H.-E., Leitz: Mikrosommar 64.

Schulterblattes, an denen Muskeln ansetzen, ist die Tiefe der resorbierten Buchten beträchtlich. Der entstandene Raum zwischen dem Muskel und dem angenagten Knochen ist mit fibrösem Gewebe erfüllt, in dem Inseln von neugebildetem Faserknochen gelegen sind. Die Markhöhle im Innern der Scapula weist Lymph- und Fettmark auf. Die Spongiosabälkchen haben schmale, osteoide Säume. Die Compacta der Rinde ist aufgelockert. Sie enthält zahlreiche erweiterte Havers'sche Räume mit Riesenzellen, Gerüst- und Fasermark und myeloischen Elementen.

### γ) Os pubis.

Im Hinblick auf die von dem Tierarzt gestellte Diagnose „Osteomalacie“ durfte das Becken nicht übergangen werden. Die Untersuchung eines neber

der Schambeinfuge entnommenen Stückes erbrachte eine Übereinstimmung mit den übrigen am Knochensystem erhobenen Befunden. Die Hauptveränderungen am Periost, sowohl nach dem Beckenraum, als auch nach außen zu, besteht wieder in Neubildung von Faserknochen in vorher durch Osteoklasten geschaffene Buchten. Der Verlauf einer Kittlinie bestätigt, daß die Resorption der erste und der Anbau der darauf folgende Vorgang ist. Eine Auflockerung der Rinde und weite HAVERS'sche Räume voll Gerüst- und Fasermark ergänzen das Bild. Nach dem Symphysenknorpel zu findet sich auch hier wieder eine subchondrale Zone mit den gleichen Hauptmerkmalen, wie sie für den Humerus beschrieben wurde: gesteigerte Resorption durch Riesenzellen, fibroblastische Knochenbildung, Gerüst- und Fasermark mit myeloischen Elementen.

#### δ) Brustwirbel.

Um ein möglichst vollständiges Bild über die Veränderung am Skelettsystem zu gewinnen, wurde eine histologische Untersuchung des 9. und 12. Brustwirbels vorgenommen. Am 9. Brustwirbel fanden sich wieder Resorption und Knochenneubildung, besonders an Stellen, an denen Sehnen einstrahlen. Unter dem Periost und in den äußeren Markräumen, sowie in der Nähe der Knorpelknochengrenze, findet sich Fasermark, das manchmal mehr in ein lockeres Gerüstmark übergeht. Das Innere des Wirbelkörpers ist erfüllt mit Lymph- und Fettmark. An den Spongiosabälkchen ist auch hier wieder Osteoid vorhanden, das nach dem alten Knochen zu jene verdichtete Zone zeigt, deren Besonderheiten bei der Besprechung des Humerus eingehendörtert wurden. Am 12. Brustwirbel sind die Veränderungen nicht so hochgradig. Es folgt nach innen zu eine Säulenschicht, die gerade verläuft. An die Knorpelreste hat sich Knochen angelagert. Das Mark der Umgebung ist fibrös; es enthält vereinzelte Riesenzellen. Die Spongiosabälkchen des 2. Wirbelkörpers sind von schmalen, osteoiden Säumen umgeben, die an ein normales Lymphmark grenzen. Ein sehr auffälliger Befund konnte an diesen Spongiosabälken erhoben werden: Mehrere von ihnen sind im Innern von innen her ausgehöhlt, ohne daß man den Eingang in die Höhle feststellen

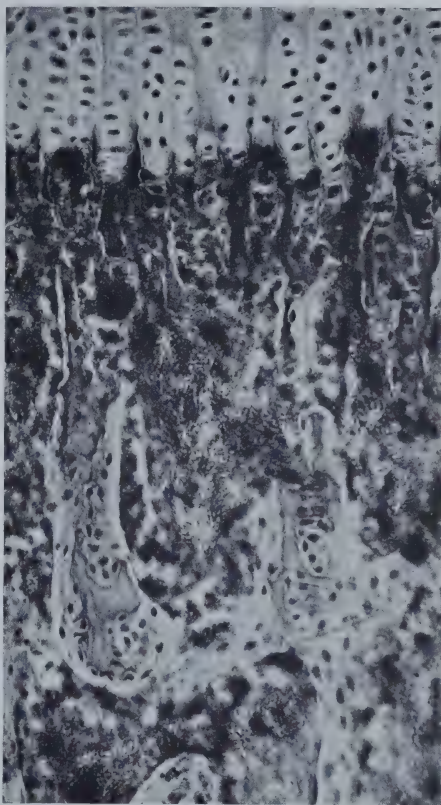


Abb. 31.

4. Rippe, links. Knorpelknochengrenze. Keine Knorpelstörung. Subchondrale Zone: Riesenzellen, fibröses Mark z. T. Gerüstmark, fibroblastische Knochenneubildungen mit osteoider Vorstufe auf den Knorpelresten und in Form selbständiger Inseln. Keine Bildung von lamellösem Knochen mit zierlichen Knochenkörperchen. Parlodionschnitt (Pr. 529), Thionin-Pikrinsäure (SCHMORL), Leitz: Apochr. 16 mm, Proj. Ok. II.



kann. Er ist vermutlich in einer anderen Schnittebene zu suchen. Der neu geschaffene Raum im Innern eines solchen Bälkchens, das also ringsherum vom normalen Lymphmark umgeben ist, wird eingenommen von einem mehr oder weniger derben Gerüstmark, das Gefäße, Riesenzellen und jene myeloischen Elemente enthält. Durch diesen Resorptionsvorgang werden — im Schnitt gesehen — einige Bälkchen förmlich in zwei getrennte Spangen geteilt. Das Bild gleicht völlig dem an einem Spongiosastück des Warzenfortsatzes beobachteten (Abb. 20). Im Rippenköpfchen der 12. Rippe, das in dem Schnitt mitgetroffen ist, finden sich vereinzelte Osteoklasten, daneben Zeichen fibroblastischer Knochenneubildung in einer subchondralen Zone, die durch Gerüstmark — und nach dem Gelenkknorpel zu mehr durch fibröses Mark — gekennzeichnet ist. Es zeigt sich also, daß auch die Wirbelkörper in gleicher Weise erkrankt sind wie das ganze übrige Skelett.

#### IV. Der Befund an den inneren Organen.

##### a) Halsorgane.

Die Schilddrüse ist sowohl rechts wie links von normaler Größe. Histologisch ergibt sich ein fast vollständiges Fehlen von Kolloid. Nur an den Randpartien sind einige Follikel mit einer ganz geringen Menge von Kolloid erfüllt. Das Follikelepithel ist zum größten Teil desquamiert und füllt in Form einzelner Epithelzellen oder Zellverbände den Raum, den das Kolloid einnehmen sollte. Die Gefäße im Bindegewebe zwischen den Follikeln sind stark mit Blut gefüllt und erweitert. Im perifollikulären Gewebe finden sich einige Lymphocytenhaufen in den Randgebieten. Der Gesamtbefund an der Schilddrüse ist schwer zu analysieren. Um zu einer Entscheidung zu kommen, müßten die Befunde mit einem gesunden Tier gleicher Rasse und gleichen Alters verglichen werden. Dazu ergab sich leider keine Gelegenheit. Die Verhältnisse ähneln in gewisser Weise den Schilddrüsenbefunden, wie sie beim menschlichen, endemischen Kretinismus beobachtet sind. Die Veränderungen dürften jedenfalls auf eine Hypothyreose hinauslaufen.

Die Epithelkörperchen wurden alle vier einer Untersuchung unterzogen, ohne daß das Bild der Epithelkörperchensklerose, wie es von ARND und HOFFHEINZ in Verbindung mit der Osteodystrophia fibrosa beschrieben wurde, zur Beobachtung kam. Das histologische Bild kann vielmehr als normal bezeichnet werden. Es finden sich vorwiegend helle und nur ganz vereinzelt dunkle Zellen (s. RITTER).

Die Glandulae submaxillaris und sublingualis zeigen keinen pathologischen Befund.

Die Halslymphdrüsen sind im Hinblick auf die sich am Kiefer abspielenden Veränderungen von besonderem Interesse. Neben starker Hyperämie, besonders im Randsinus, und starkem Pigmentreichtum weisen die Halslymphknoten eine Wucherung von Endothelzellen auf, die um die Lymphfollikel in Form von soliden Zellsträngen angeordnet sind. Besonders im VAN GIESON-Präparat sind diese Zellstränge gut zu sehen. Sie nehmen an der einen Seite einen solchen Umfang an, daß die gesamte Struktur des Lymphknotens dadurch verwischt ist. An anderen Stellen liegen diese großen Endothelzellen mit blasigem Kern zu Gruppen vereinigt und einzeln frei zwischen den roten Blutkörperchen und Lymphzellen. Im übrigen ist an den zahlreichen Kernteilungsfiguren eine rege Tätigkeit in den Keimzentren festzustellen. Die Wandung der sehr zahlreichen Gefäße ist fast durchweg hyalin verdickt.

Man geht also wohl nicht fehl, die rege Tätigkeit in den Keimzentren und die Vermehrung der Endothelzellen als den Ausdruck des Reizes anzusehen, der durch die Einschmelzungsprozesse am Kiefer ausgeübt wurde.

### b) Brustorgane.

Der Thymus ist noch vorhanden. Erst an einigen Stellen ist das Thymusgewebe von Fettgewebe ersetzt. Das Parenchym ist von nur schmalen Bindegewebssträngen durchzogen. Die darin verlaufenden Gefäße sind erweitert und prall mit Blutkörperchen gefüllt. Im Mark sowohl wie in der Rinde finden sich zahlreiche größere und kleinere, frische Blutungen. Die HASALL'schen Körperchen sind auffallend klein und gering an Zahl. Sie zeigen nicht die gewöhnliche, rundliche Form und die zwiebelschalenartige Lagerung mehrerer Schichten. Sie bestehen vielmehr durchweg aus einer einzigen Schalenschicht. Diese wiederum schließt sich nicht ringförmig, sondern ist halbmondförmig geöffnet.

Die Lunge weist außer Blutungen und Hyperämie und einer geringen Verdickung der Pleura keine besonderen Veränderungen auf. Zeichen einer Entzündung finden sich nicht.

Der Herzmuskel zeigt im Sudanpräparat ganz vereinzelt fettige Metamorphose einzelner Fasern.

### c) Bauchorgane.

Die Leber ist hyperämisch, weist aber keinerlei Verfettung auf. Es finden sich im Parenchym einige kleine Cysten, die mit einer geronnenen, serösen Flüssigkeit gefüllt sind. Im übrigen bietet die Leber keine Besonderheiten.

Die Milz führt auffallend dicke Trabekel. Im Bindegewebe der Trabekel finden sich an einigen Stellen scharf begrenzte, helle Stellen, in denen ein oder mehrere Zellen mit klarem Kern eingeschlossen sind (s. LANGENSKIÖLD). Die Wandungen der Gefäße sind z. T. hyalin verdickt. Die Follikel sind klein und ziemlich scharf begrenzt. Ganz vereinzelt finden sich Nester von Endothelzellen in gleicher Weise, wie sie für die Halslymphknoten beschrieben wurden.

Die Nieren zeigen eine Hyperämie der Rinde. Ganz vereinzelt finden sich einige zellreiche Glomeruli, deren Kapseln jedoch frei von Veränderungen sind. In der Nähe einiger Glomeruli liegen an mehreren Stellen Anhäufungen von 10—20 epithelartigen Zellen, die im VAN GIESON-Präparat durch ihren großen, klaren Kern mit schönem Chromatingerüst und ihrem hellen Plasma besonders deutlich hervortreten. Unmittelbar unterhalb der Kapsel liegen mehrere Cysten, in denen etwa 4—6 Glomeruli Platz haben könnten. Die Wand dieser Cysten ist von einem zarten Endothel ausgekleidet. Der Inhalt der Cysten ist geronnenes Blut oder Serum. Der tubuläre Apparat der Nieren zeigt leichte degenerative Veränderungen im oberen Teil, die in den unteren Abschnitten höhere Grade annehmen. In den Tubuli contorti (t. Ordnung) findet sich an einigen Stellen außerdem eine Verfettung der Epithelien. In den Harnkanälchen liegen einige Epithelzyylinder. Kalkmetastasen wurden nicht beobachtet.

Die Nebennieren weisen eine Hyperämie auf, besonders im Gebiet

des Übergangs von Mark und Rinde. Sonst finden sich keine weiteren pathologischen Veränderungen.

Die Ovarien enthalten viele GRAAF'sche Follikel in allen Stadien der Entstehung. In einem Schnitt findet sich ein Corpus fibrosum. Die Ovarien sind außerdem ohne pathologischen Befund.

Zusammenfassend ergibt sich: Die inneren Organe zeigen eine Hyperämie, die vermutlich durch den Chloroformtod oder durch Erstickung hervorgerufen ist. Die Schilddrüse enthält nur Spuren von Kolloid und weist Desquamation des Follikel-epithels auf. Die Veränderungen sprechen im Sinne einer Hypothyreose. Die Halslymphknoten zeigen Veränderungen vermutlich als Folge einer Reizung durch den Einschmelzungsprozeß am Kiefer. Die Nieren weisen geringfügige parenchymatöse Schädigungen auf. Auf die eigenartigen Endothelzellennester, die in Schilddrüse und Nieren beobachtet wurden, wird bei dem Kapitel über das Wesen der Osteodystrophia fibrosa näher eingegangen werden. Kalkmetastasen wurden in den untersuchten Organen nicht gefunden.

## B. Einordnung des Falles in das morphologische System der malacischen Knochenerkrankungen.

### I. Die Diagnose.

Im vorliegenden Fall handelt es sich um eine Erkrankung des gesamten Knochensystems. Das histologische Gesamtbild setzt sich zusammen aus dem Ineinandergreifen zweier verschiedener Prozesse. Auf der einen Seite liegt eine hochgradige Zerstörung des Knochens vor. Als Beweis hierfür muß die ungeheure Zahl von Riesenzellen angesehen werden, die teils im Markgewebe auftreten, teils in Lakunen dem Knochen anliegen. Auch die zahlreichen leeren Buchten sprechen für erhöhten Abbau. Auf der anderen Seite findet sich ein Knochenanbau, der die Grenzen des Normalen übersteigt. Er ist verbunden mit einer fibrösen Umwandlung des Markgewebes an den Stellen erhöhter Apposition. Besonders an den Kiefern und den subchondralen Zonen wird dadurch das Lymphmark verdrängt. Der neuentstandene Knochen ist zunächst fibroblastisches Osteoid, das später in Faserknochen übergeht. Die schmalen osteoiden Säume, die sowohl am lamellösen Knochen des Markes und der Rinde wie auch am Faserknochen, vor allem unter dem Periost, beobachtet wurden, sind wenigstens z. T. mit Sicherheit durch Anbau und verkalkter Knochensubstanz zu erklären, wofür der Verlauf einer Kittlinie in unmittelbarer Nachbarschaft einen Beweis darstellt. Ob daneben noch eine Halisterese vorliegt, läßt sich aus Mangel technischer Methoden nicht entscheiden (AXHAUSEN). Ihr Nachweis würde jedoch als Unterstützung der Beweise für vermehrten Abbau verwertet werden können.

Bei der Suche nach der Diagnose zeigt sich, daß die wesentlichsten Punkte der Befunde am Knochensystem mit den histologischen Eigentümlichkeiten des Krankheitsbildes der Ostitis fibrosa übereinstimmen. Nach v. RECKLINGHAUSEN dürfen wir eine Ostitis fibrosa dann diagnosti-



ieren, „wenn mikroskopisch Riesenzellen und die deutlichen Zeichen akunärer Resorption, und wenn daneben ein Neubau faserhaltigen Gewebes, und in diesem der jugendliche Typus des richtigen Osteoidkalkchens zu erkennen ist“. V. RECKLINGHAUSEN sagt weiter, daß der verborgene und mißgestaltete Knochen seine typische Form trotz des starken, sogar als „überstürzt“ bezeichneten, Umbaus bewahrt hat. Diese Ausführungen V. RECKLINGHAUSEN's haben der Kritik der letzten Jahrzehnte standgehalten und gelten noch heute als die Kriterien für die Diagnose der Ostitis fibrosa.

Aufbauend auf den Arbeiten V. RECKLINGHAUSEN's hat dann später CHRISTELLER seine Einteilung der malacischen Erkrankungen ausgearbeitet. Demnach gehört die vorliegende Erkrankung zur Gruppe der metabolischen Erkrankungen und damit zur Osteodystrophia fibrosa. Es erhebt sich die Frage, zu welcher Untergruppe im einzelnen der eingangs beschriebene Fall zu rechnen ist. Um hierüber eine Entscheidung zu treffen, muß zunächst festgestellt werden, ob eine porotische oder sklerotische Form vorliegt. Eine Analyse der Befunde zeigt, daß nirgends eine Verdichtung oder Kondensierung des Knochens zu finden ist, in der Weise, wie sie CHRISTELLER für einen Affenschädel (1923, S. 130) abgebildet hat. Dadurch würde das spezifische Gewicht der Knochensubstanz erhöht werden und der Knochen die Schwere von Elfenbein annehmen. In unserem Fall ist davon nichts bemerkbar. Die Knochen sind weder übermäßig schwer, noch beim Sägen besonders hart. Der vorliegende Krankheitszustand entspricht also keineswegs einer Ausheilungsform etwa in der Art, daß die entstandenen Räume mit hartem amellösen Knochen gefüllt werden, wie es bei Sklerosierungsprozessen auf Grund eigener Untersuchungen nachgewiesen wurde. Die Fähigkeit, amellösen Knochen zu bilden, ist im vorliegenden Fall überhaupt stark vermindert, vielleicht sogar gänzlich aufgehoben. Wo Schalenknochen überhaupt gebildet wird, erscheint er in Form von Osteoid. Daß dieses Osteoid bei der Osteodystrophia fibrosa fehlen kann, hat ASKANAZY gezeigt.

Eine sklerotische Form ist also auszuschließen. Die massenhaft vorhandenen Riesenzellen haben vielmehr die Corticalis der langen Hörenknochen aufgelockert. Auch das Schädeldach läßt eine Unterscheidung von Tabula externa und interna mit bloßem Auge nicht mehr zu. Wenn auch die poröse Beschaffenheit der Knochen makroskopisch nicht überall eindeutig zu erkennen ist, so zeigt doch das histologische Bild, daß eine bimssteinartige Struktur vorliegt, die im Hinblick auf die Ostitis fibrosa von KAUFMANN mit „Schaumgebackenem“ verglichen wurde. Es liegt demnach eine porotische Form der Osteodystrophia fibrosa vor.

Darunter sind nach CHRISTELLER zwei Gruppen zu unterscheiden, die hypostotische und die hyperostotische Form. In dieser Beziehung



ist es etwas schwieriger, eine Entscheidung zu treffen, da die Verhältnisse an den einzelnen Knochen geringe Unterschiede aufweisen. Bezüglich des Schädeldaches und der Kieferknochen ist trotz der Auflockerung die Verdickung ausgesprochen. Das Schädeldach ist annähernd von doppelter Dicke als beim normalen Hund gleichen Alters. Die Auftreibung der Kieferknochen ist derart, daß sie geradezu den Höhepunkt des osteodystrophischen Prozesses darstellt. An den langen Röhrenknochen ist die Frage der Verdickung nicht so leicht zu entscheiden. Makroskopisch ist sie jedenfalls nicht bedeutend. Nimmt man aber das histologische Bild bei der Beurteilung zu Hilfe, so ergibt sich, daß in die unter dem Periost gebildeten Buchten neuer Faserknochen eingelagert ist, der an einigen Stellen deutlich die Konturlinie des normalen Knochenprofils übersteigt. Wenn nun noch die subperiostalen, dystrophische Verkalkungsstellen als osteophytäre Bildungen angesprochen werden, dann ist man wohl berechtigt, eine Verdickung auch an den langen Röhrenknochen feststellen zu dürfen. Einige andere kleinere Knochen zeigen ähnliche Bilder wie die langen Röhrenknochen. Wenn an ihnen die Verdickungen nicht so beträchtlich sind, dann läßt sich das vielleicht damit erklären, daß sich an verschiedenen Stellen des Knochensystems die Erkrankung in verschiedenen Stadien befindet. An Orten besonders stark gesteigerter Resorption kann sogar vorübergehend eine Verdünnung beobachtet werden, ohne daß dadurch die Einordnung des Gesamtfalles in die hyperostotische Form in Frage gestellt zu werden brauchte. Da im vorliegenden Fall eine Verdickung des Knochens zweifellos im Vordergrund steht, erscheint es wohl berechtigt, den Fall unter die hyperostotische Form einzureihen.

Da der Hund im Alter von  $8\frac{1}{2}$  Monaten — als jugendliches Tier — getötet wurde, zählt der Fall zur Gruppe der juvenilen Formen. Nach CHRISTELLER ist diese ebenso wie die adulte Form der Ostitis fibrosa v. RECKLINGHAUSEN dann zuzurechnen, wenn sie mit Tumor- und Cystenbildung einhergeht. Es muß daher, um zur endgültigen Diagnose zu kommen, die Frage der Tumoren und Cysten in bezug auf den vorliegenden Fall untersucht werden.

Trotz eingehender Untersuchung verschiedener Abschnitte des Skelettsystems konnte nur an den Kiefern eine Tumor- und Cystenbildung festgestellt werden. Diese Erkrankung des Kiefers an und für sich mit der tumorförmigen Auftreibung, dem fibromartigen, straffen Gewebe, den Riesenzellen, den fibroplastischen Knocheninseln und den Blutseen kann als „intraossöse Epulis“ angesehen werden (NÉLATON, RÖMER, SIEGMUND-WEBER). In Verbindung mit einer generalisierten Ostitis fibrosa kommt dieser sog. „Epulis“ eine ganz besondere Bedeutung zu. SIEGMUND hat gezeigt, daß diese Form der intraossösen Epulis mit den braunen Tumoren identisch ist. Vornehmlich die Untersuchungen von GAUGELE, LUBARSCH, KONJETZNY, MÖNCKEBERG u. A. haben dargelegt

Daß es sich bei den braunen Tumoren, die in Verbindung mit der Ostitis fibrosa entstehen, nicht um Geschwülste im Sinne des Wortes, sondern um Pseudotumoren, um resorptive Neubildungen handelt.

Daß im vorliegenden Fall in den braunen Tumoren auch Cysten zur Beobachtung gelangten, vervollständigt das Bild.

Die Diagnose für den gesamten vorliegenden Fall lautet also: Juvenile, hyperostotisch-porotische Form der Osteodystrophia fibrosa mit Pseudotumoren und Cysten.

Diese Form der Osteodystrophia fibrosa wurde von CHRISTELLER mit „pseudorachitisch“ bezeichnet. Es erscheint notwendig, die Differentialdiagnose gegenüber der echten Rachitis auszuarbeiten. Andererseits verlangt die klinische Diagnose „Osteomalacie“ ein Eingehen auf die Differentialdiagnose gegenüber der Osteomalacie. Das eigenartige Gerüstmark und die subperiostalen Blutungen, sowie die lebhaften Resorptionerscheinungen machen es ferner notwendig, festzustellen, warum der vorliegende Fall nicht zur Gruppe der reinen Osteoporosen, der MÖLLER-BARLOW'schen Krankheit und dem Skorbut, zu rechnen ist.

## II. Die Differentialdiagnose.

### a) Rachitis.

Der Begriff der Rachitis im allgemeinen wurde früher (und wird vielfach noch immer) von der Veterinärmedizin recht weit gefaßt (s. RIEVEL, KITT, JOST und KOCH, HUTYRA-MAREK). In der menschlichen Pathologie ist in den letzten Jahrzehnten eine Änderung hierin eingetreten. Besonders die Arbeiten von M. B. SCHMIDT, SCHMORL, CHRISTELLER u. A. haben uns gelehrt, die Rachitis enger zu umgrenzen, und die Diagnose auf den Nachweis ganz bestimmter histologischer Kriterien zu stützen. Vor allem darf man heute den makroskopischen Veränderungen nur noch eine ganz geringe Bedeutung zumessen, weil, wie sich zeigte, leichte oder ähnliche makroskopische Veränderungen auch bei anderen malacischen Erkrankungen auftreten können, worauf besonders L. PICK und CHRISTELLER mit allem Nachdruck mehrfach hingewiesen haben. Ausgehend von der menschlichen Form ist das wesentlichste obligatorische Merkmal der Rachitis am histologischen Präparat, als Zeichen eines unerkalkt gebliebenen, jedoch im Übermaß gebildeten Knochens, der reife, osteoide Saum (POMMER, SCHMORL, OEHME, FINDLAY). Ohne daß der Nachweis des breiten Osteoidsaumes gelingt, darf die Diagnose „Rachitis“ nicht gestellt werden. Dafür sind die bekannten Vorkehrungen in Entkalkung und Färbung zu treffen, die vor allem von POMMER und SCHMORL angegeben wurden. Als nächstes Merkmal findet sich eine durch mangelnde Verkalkung hervorgerufene Knorpelstörung (M. B. SCHMIDT, LOBECK u. A.) und ein etagenförmiger Bau der Knorpel-

markkanäle (SCHMORL). Das Mark kann dabei fibröse Umwandlung zeigen, braucht es aber nicht (M. B. SCHMIDT, OEHME). Mit Sicherheit — und darin sind sich alle Autoren einig — ist eine erhöhte Resorption dem Wesen der Rachitis fremd.

Legt man diesen Maßstab an bei der histologischen Diagnose des vorliegenden Falles, so ergibt sich, daß ein der menschlichen Rachitis gleichendes Bild nicht vorliegt. Die osteoiden Säume sind schmal, die Knorpelstörung ist unbedeutend. Die Resorptionen hingegen überschreiten weit das physiologische Maß. Die vorhandene fibröse Markumwandlung spricht weder für noch gegen Rachitis, weil sie ja nur ein fakultatives Symptom der Rachitis darstellt.

Zusammenfassend muß daher die Diagnose Rachitis abgelehnt werden. Ja, CHRISTELLER, der wohl einer der besten Kenner auf diesem Gebiet war, berichtet 1926 noch, daß ihm — außer einem Falle SCHMORL's — nicht ein einziger Hund mit echter Rachitis bekannt geworden sei.

Es könnte, wie es MELLANBY getan hat, der Einwand erhoben werden, daß das Tier „anders reagiert“ als der Mensch. Wenn aber — wie in vorliegenden Fall — die am Tier festgestellten Verhältnisse bis in alle Einzelheiten einer wohlbekannten menschlichen Erkrankung gleichen — nämlich der Ostitis fibrosa — dann ist, das hat CHRISTELLER 1926 ausdrücklich hervorgehoben, nicht einzusehen, warum man trotzdem zu der Diagnose Rachitis kommen soll, indem man einfach die Annahme macht, daß das Tier „anders reagiere“ als der Mensch.

#### b) Osteomalacie.

Die klinische Diagnose Osteomalacie wird in der Veterinärmedizin vielfach gebraucht in demselben Sinne wie das Wort Knochenweich (KITT, HUTYRA-MAREK). Es soll dabei offenbar über die Art des Prozesses im histologischen Sinne nichts ausgesagt, sondern nur betont werden, daß eine malacische Erkrankung vorliegt. Vom pathologisch-anatomischen Standpunkt aus kann natürlich eine solche Diagnose nicht befriedigen. Es muß vielmehr versucht werden, das Wesen der Erkrankung weiter zu analysieren. Die Osteomalacie im pathologisch-anatomischen Sinne wird heute wohl allgemein — ebenso wie die Rachitis — zur Gruppe der achalikotischen Malacien gerechnet (CHRISTELLER, CORSON WHITE, SCHMORL u. A.). Es läßt sich technisch eben nicht nachweisen, ob das Osteoid entkalkt (v. RECKLINGHAUSEN) oder unvollständig verkalkt (AXHAUSEN) darstellt. Eine Kritik der Halisterese fragt findet sich bei CHRISTELLER. Da es sich bei der Osteomalacie um eine Erkrankung des erwachsenen Knochensystems handelt (s. MAXWELL und MILES), fällt die Frage der Knorpelstörung weg. Das wesentlichste Charakteristikum der Osteomalacie ist demnach das breite Osteoid



Eine Steigerung der Resorption findet sich nicht. Das Mark ist vorwiegend Fett- oder Lymphmark.

Da es sich bei dem eingangs untersuchten Mops um ein junges Tier handelt, das Osteoid sehr schmal ist und sich ungeheure Resorptionen finden, so muß die Diagnose des Klinikers „Osteomalacie“ vom pathologisch-anatomischen Standpunkt aus zurückgewiesen werden, denn der überstürzte Umbau und das Fasermark gehören nicht zum eigentlichen Wesen der Osteomalacie.

Die Beziehungen der Osteodystrophia fibrosa zur Osteomalacie sollen hier in Kürze erörtert werden: Nach v. RECKLINGHAUSEN und LANG ist die Entstehung der Osteodystrophia fibrosa auf dem Boden einer Osteomalacie sehr wahrscheinlich. SCHMORL hat dieser Beziehung der Osteodystrophia zur Osteomalacie und auch zur Rachitis eine kritische Arbeit gewidmet. Demnach kann auf Grund der aus seinem Institut hervorgegangenen Arbeiten von SCHÖNEBERGER, HART und MOLINEUS eine Kombination von Osteodystrophia fibrosa und Osteomalacie vorliegen. Wie aber die Arbeiten von HARTMANN, FUJII, HABERLIN und PALTAUF zeigen, gibt es auch Fälle, in denen eine solche Kombination nicht vorhanden ist. SCHMORL kommt daher zu dem Schluß, daß die generalisierte Osteodystrophia fibrosa eine selbständige Erkrankung ist, die keine Beziehungen hat zur floriden Rachitis oder zur floriden Osteomalacie. Die Untersuchung des vorliegenden Falles gibt die Bestätigung für diese Ansicht.

### c) MÖLLER-BARLOW, Skorbut, Osteoporosen und progressive Knochenatrophie.

Nach CHRISTELLER gehört die MÖLLER-BARLOW'sche Krankheit und der Skorbut histologisch zur Gruppe der Osteodystrophia rareficans, der Osteoporosen. Durch NAUWERCK, E. FRAENKEL, LOOSER, ASCHOFF-KOCH u. a. ist das Bild des Skorbuts und seiner Jugendform, der MÖLLER-BARLOW'schen Krankheit, gut bekannt. Das histologische Bild wird bestimmt durch eine normal verlaufende Resorption, der ein Unvermögen gegenübersteht, neuen Knochen zu bilden (CHRISTELLER, HERZOG). Außerdem findet sich eine hämorrhagische Diathese, die zu Blutungen in den Organen, zu Blutungen unter dem Periost, im Endost und am Zahnfleisch führt. Ein Rosenkranz kann sich finden, wie E. FRAENKEL, HART, WIMBERGER u. A. gezeigt haben. Als ein besonders charakteristisches Symptom gilt das Gerüstmark, dessen Entstehung CHRISTELLER durch atrophische Vorgänge erklärt. An der Knorpelknochengrenze — besonders der Rippen — wurde von FRAENKEL, HART, und ASCHOFF-KOCH eine Trümmerfeldzone beschrieben, in deren Bereich es zu Frakturen des Knochens kommen kann.

Vergleichen wir diese beim Skorbut erhobenen Befunde mit denen unseres Mops festgestellten, so zeigt sich, daß die Abgrenzung gegenüber dem Skorbut bzw. der MÖLLER-BARLOW'schen Krankheit im



Vergleich zu den anderen malacischen Erkrankungen am schwierigsten ist. Beim Skorbut, sowie beim vorliegenden Fall, haben wir subperiostale Blutungen. Bei den in der Thymus unseres Falles gefundenen Blutungen handelt es sich jedoch um frische Blutungen, vermutlich als Folge des Chloroformtodes. Doch finden wir Blutseen zweifellos älteren Datums in den Auftreibungen der Kiefer. Eigentliche Zahnfleisch- und Muskelblutungen sowie ausgedehnte Blutungen im Knochenmark wurden hingegen nicht beobachtet. Gerade die ungeheuren Markblutungen sind aber nach NAUWERCK, E. FRAENKEL, LOOSER, ASCHOFF-KOCH, SCHMORL u. A. für die Diagnose des Skorbutus bedeutungsvoll. Sie gehören aber nicht als obligater Faktor zum Wesen der Osteodystrophia fibrosa. Auch REHN hat sie bei seinem Fall von Schnüffelkrankheit beim Schwein nicht gefunden. In unserem Fall finden sich ebenfalls, wie gesagt, keine Markblutungen in dem Maße, wie sie beim Skorbut beobachtet wurden. Diese Tatsache spricht gegen Skorbut. Wenn trotzdem an einigen Stellen kleinere Blutungen gefunden wurden, so können sie aus den angeführten Gründen nicht als unbedingte Beweise für Skorbut herangezogen werden.

Das Gerüstmark spricht zwar für Skorbut, doch schon CHRISTELLER hat gezeigt, daß es in Fällen von Osteodystrophia fibrosa eine andere Bedeutung hat als beim Skorbut. Ich werde darauf in einem späteren Kapitel zurückkommen.

Was ist nun das Entscheidende? Nach meiner Ansicht der Umstand, daß die MÖLLER-BARLOW'sche Krankheit und der Skorbut zu Gruppe der reinen generalisierten Osteoporosen zählen (CHRISTELLER) und daß im vorliegenden Fall eine reine generalisierte Osteoporose eben nicht vorliegt. Doch sei erwähnt, daß an einigen begrenzten Stellen eine örtlich begrenzte Osteoporose vorhanden ist, die dem Bilde der progressiven Knochenatrophie (ASKANAZY) gleicht (Abb. 24). Es sind das auch besonders jene Stellen, die innerhalb eines Spongiosabalken das Bild der dissezierenden Atrophie aufweisen (Abb. 20). SCHÖN L. PICK hat die begründete Vermutung ausgesprochen, daß solche Bilder als der Beginn einer Osteodystrophia fibrosa anzusehen sind. Diese Ansicht kann vollauf bestätigt werden. Von einer generalisierten Osteoporose kann im vorliegenden Fall also keine Rede sein. Der Knochenanbau ist am Schädel sowohl wie am Kiefer und den Extremitätenknochen so auffallend, daß damit als Hauptdiagnose ein Skorbut bzw. MÖLLER-BARLOW nicht in Frage kommt, bei dem stets die Neubildung von Knochensubstanz sehr beschränkt ist (SCHMORL).

Höchstens könnte man sagen, daß in unserem Fall eine geringe skorbutische Komponente mit der Osteodystrophia fibrosa verbunden ist.

Die Ernährungsversuche der letzten Jahrzehnte, besonders die Ergebnisse der Vitaminforschung haben, wie KIHN berichtet, gezeigt, daß die einzelnen Bilder bei den avitaminotischen Knochenkrankungen selten ganz

ein zur Darstellung gebracht werden können. Gerade bei der Entstehung des Skorbutus scheint, wie LUBARSCHE hervorgehoben hat, neben dem Vitaminmangel der Eiweißmangel noch eine Rolle zu spielen. Welche histologischen Veränderungen aber durch den Mangel an Eiweiß allein (bei genügender Zufuhr von Vitamin C) hervorgerufen werden, scheint gegenwärtig noch nicht klar zu sein. Wie ASCHOFF und GANS gezeigt haben, kann schon einseitige Ernährung bzw. Unterernährung allein Störungen im Sinne einer Osteoporose erzeugen. Diese Fragen erfordern eine weitere experimentelle Klärung.

Im übrigen ist das vorliegende Krankheitsbild so typisch für eine Osteodystrophia fibrosa, daß man — so lange dieses Krankheitsbild als ein morphologisch selbständiges existiert und seine Ätiologie noch unbekannt ist — in diesem Fall an der Hauptdiagnose Osteodystrophia fibrosa festhalten muß. Das Bild gleicht der beim Menschen sowohl wie bei Tieren bekannten Erkrankung in solchem Maße, daß es auch nicht nötig ist, anzunehmen, daß der Hund „anders reagiert“ als andere Tiere und der Mensch.

## 2. Beitrag zur Pathogenese der Osteodystrophia fibrosa.

### I. Die Aufgabestellung.

Die Osteodystrophia fibrosa stellt einen sehr verwickelten Symptomenkomplex dar, der aus dem Zusammenwirken einzelner pathologischer Veränderungen entstanden ist. Die Bemühungen zur Klärung ihrer Pathogenese müssen sich darauf richten, diesen Komplex von Symptomen in einzelne Komponenten pathologischen Geschehens zu zerlegen.

Geht man von dem Gedanken aus, daß die Osteodystrophia fibrosa — wie in unserem Fall — eine Systemerkrankung des gesamten knochenbildenden Apparats („osteogene Atmosphäre“, v. RECKLINGHAUSEN) darstellt, so gilt es zunächst, das normale Knochensystem als Einheit zu analysieren, um eine Grundlage zu schaffen, von der aus die pathologischen Vorgänge beurteilt werden können.

Der normale Knochen („Knochen als Organ“, HINTZSCHE) ist ein dynamisches Konglomerat, dessen Einzelteile zu verschiedener Zeit des Lebens entstanden sind. Fast alle Stadien der Entwicklung liegen gleichzeitig vor — wenigstens noch im jugendlichen Alter. Es erscheint daher am zweckmäßigsten, die einzelnen zeitlichen Phasen der normalen Entwicklung aufzusuchen, um festzustellen, wie das dynamische Bild hat entstehen können. Einen Versuch in dieser Richtung habe ich in meiner Arbeit: „Bone-pathology and its relation to the problem of otosclerosis“ unternommen.

Die Pathologie des Knochensystems ist vornehmlich eine Wiederholung, eine Karikatur, der normalen Entwicklung, die nach M. B. SCHMIDT durch das Auftreten zweier pathologischer Formen, der Halisterese (CHRISTELLER, AXHAUSEN) und Metaplasie (s. BORST, RHODE) erweitert

wird. Bei der Suche nach der Histogenese der Osteodystrophia fibrosa muß es daher die Aufgabe der Forschung sein, festzustellen, in welcher Weise die funktionellen Phasen der zeitlichen Entwicklung des normalen Knochensystems gestört sind, da mit sich das unserem Auge als Zustand vorliegende räumliche pathologische Bild ergeben konnte.

Die Phasen der Entwicklung des Knochensystems beim Menschen gleichen im Prinzip denen des Hundes. Es darf daraus wohl die Berechtigung abgeleitet werden, die beim Hund beobachteten Störungen der einzelnen Phasen mit den beim Menschen gefundenen zu vergleichen. Ein solches Vorgehen erscheint um so mehr gerechtfertigt, als gerade die Histogenese der vorliegenden Erkrankung, besonders ihrer adulten Form bzw. PAGET-Form, beim Menschen sowie beim Tier besonders gut bekannt ist.

## II. Die funktionellen Phasen der normalen Knochenentwicklung

Die Ergebnisse der normalen Anatomie des Knochensystems aus dem letzten Jahrzehnt — insbesondere die Arbeiten WEIDENREICH's — haben uns gelehrt, zwei Arten von Knochen zu unterscheiden: den Faserknochen und den Schalenknochen. Es ist das Verdienst WEIDENREICH's, erwiesen zu haben, daß der Unterschied dieser beiden Knochenarten weniger in dem Ort ihrer Bildung liegt — wie bisher immer betont wurde — als vielmehr in der Art und dem Zeitpunkt ihrer funktionellen Entstehung.

Der Faserknochen entsteht durch die unmittelbare Verkalkung (Verknöcherung?) von Bindegewebe. Die Tätigkeit besonderer in epithelartiger Reihe angeordneter Zellen kann dabei nicht beobachtet werden (v. KORFF, LERICHE und POLICARD). Die von verkalkter Interzellularsubstanz eingeschlossenen Zellen zeigen im Schliff oder nach der Thionin-Pikrinsäuremethode SCHMORL's eine plumpe, wanzenartige Form mit kurzen, spärlichen Ausläufern. Die Bindegewebsfibrillen können in Form eines Geflechtes verlaufen. Der Knochen zeigt keinen lamellösen Bau. Der Faserknochen ist der ontogenetisch ältere Knochen (WEIDENREICH, FOOTE). Beim Menschen findet er sich wieder: einmal als erstes Stadium der sog. bindegewebig vorgebildeten Knochen, ferner vermutlich als die erste Ablagerung des periostalen Knochens und weiterhin immerwährend an den Sehnenansätzen (WEIDENREICH).

Der Schalenknochen („Knochen als Gewebe“, HINTZSCHE) entsteht durch die Tätigkeit oder in Gegenwart besonderer in Reihen angeordneter Zellen, der Osteoblasten. Die eingeschlossenen Zellen zeigen als Osteocyten im Schliff oder nach SCHMORL-Färbung die allerzitiertesten Formen mit länglichem Körper und zahllosen feinsten Ausläufern.



Die Ablagerung des Schalenknochens erfolgt in Lamellenform. Sein höchstes Entwicklungsstadium ist das HAVERS'sche System, das Osteon (BIEDERMANN). Das Osteon stellt also sowohl ontogenetisch als auch phylogenetisch die höchste Stufe der Knochenentwicklung dar. Ein Unterschied zwischen periostalem und endostalem, lamellösen Knochen besteht einmal in bezug auf die Lokalisation, als einer Bildung von außen, die zentrifugal einen Stamm umhüllt, und als einer Bildung im Innern, die zentripetal einen Hohlraum auskleidet. Als Folge der örtlichen Verschiedenheit liegt ein weiterer Unterschied darin, daß sich im periostalen, lamellösen Knochen seiner Lage entsprechend eingebaute Bindegewebsbündel als SHARPEY'sche Fasern finden. In bezug auf Lokalisation, Wachstumsrichtung und Gehalt an Fasern bestehen also Unterschiede im Schalenknochen, die auch von manchen Autoren (KÖLLIKER, v. EGGELING, HINTZSCHE, HEIDSIECK u. A.) besonders hervorgehoben wurden. In meinen früheren Arbeiten habe ich daher in Anbetracht dieser Unterschiede im Sinne KÖLLIKERS den periostalen Anteil des Schalenknochens als lamellösen Faserknochen bezeichnet. Im Hinblick auf den Entstehungsmodus besteht aber kein Unterschied. Beide, sowohl der lamellöse Knochen des Periostes als auch der des Endostes stellen funktionell gesehen einen Schalenknochen dar (WEIDENREICH). Da hier die Knochenentwicklung vom funktionellen Gesichtspunkt aus betrachtet werden soll, müssen hier die histologischen Unterschiede zwischen periostalem und endostalem Knochen (Periostknochen und Markknochen, v. EGGELING) zurückstehen hinter dem gemeinsamen Modus der Bildung, der alle Arten von Schalenknochen verbindet.

Um eine Auflösung des histologischen Knochenbildes in einzelne funktionelle Phasen herbeizuführen, bin ich einen Schritt weiter gegangen und habe den Faserknochen als verkalktes Bindegewebe mit dem verkalkten Knorpel auf eine Stufe gestellt. Beide Vorgänge habe ich unter dem Ausdruck „Kernbildung“ zusammengefaßt. Die Bezeichnung „Kern“ wurde in Analogie zur Kristallbildung gewählt, denn das verkalkte Bindegewebe und der verkalkte Knorpel stellen das Fundament dar, auf dem der Schalenknochen abgelagert wird. Weitere Untersuchungen werden Aufschluß darüber geben müssen, ob der Schalenknochen zur Entstehung stets und unter allen Umständen eines solchen „Kernes“ bedarf. Soweit ich die Verhältnisse auf Grund eigener Untersuchungen übersehe, ist das tatsächlich der Fall. Der Schalenknochen wird abgelagert auf ein „Knorpelmodell“ bei den knorpelig angelegten Knochen (z. B. Röhrenknochen) und auf einen vorher entstandenen Faserknochen“ bei den bindegewebig vorgebildeten Knochen (z. B. Schädeldach).

Der Hauptton bei der Bildung der „Kerne“ muß m. E. auf eine aktive Tätigkeit der Intercellularsubstanz gelegt werden, wozu uns die



Lehre vom Mesenchym ermutigt (HUECK, HERXHEIMER). Zwischen der vorher nach der Seite des Faserknochens oder Knorpels mehr oder weniger differenzierten Zellen vermehrt sich die Intercellularsubstanz und verkalkt anschließend. Der so entstandene Faserknochen und der verkalkte Knorpel stellen den „Kern“ dar.

Die Intercellularsubstanz des Faserknochens ist zwar im chemischen Sinne verschieden von der des Knorpels, ebenso wie etwa der lamellöse periostale Knochen durch seine Lokalisation sich vom endostalen Knochen unterscheidet. In der Art ihrer Entstehung verhalten sich die „Kerne“ aber gleichmäßig.

Das gleichsinnige Verhalten gegenüber dem Schalenknochen, sowie der gleiche Modus der Entstehung berechtigen also dazu, den Faserknochen und den verkalkten Knorpel als „Kerne“ auf eine Stufe zu stellen als Vorstufe in der funktionellen Entwicklung des Knochensystems, dessen höchste Stufe dann der Schalenknochen darstellt.

Die Vorstufe der „Kerne“ ist ein Stadium der Differenzierung. Ausgehend von einer Grundstufe, dem undifferenzierten, mesenchymalen Gewebe (HUECK), lassen diejenigen Zellen und Zellgruppen, die im Sinne von ROUX bestimmt sind, das Stützgewebe des Körpers zu bilden, sehr früh schon erkennen, in welcher Richtung die Entwicklung fortgehen soll. Die zum Knorpel führenden mesenchymalen Zellen sind gerundet und blasig. Die Zwischensubstanz färbt sich mit Hämatoxylin blau. Die zum Faserknochen führenden Zellen zeigen zwar wenige eigentliche Veränderungen, sie rücken aber auseinander, und die zwischen ihnen auftretende Intercellularsubstanz färbt sich rot mit Eosin. Es ist eine Differenzierung also sowohl im Hinblick auf die Zellen selbst, als auch auf die Intercellularsubstanz eingetreten. Das Stadium soll daher als das der Differenzierung bezeichnet werden. Bevor nach dieser Richtung hin nicht weitere Untersuchungen vorliegen, ist es schwer zu sagen, wo die Grenze liegt, und ob bereits die bloße Vermehrung der Intercellularsubstanz zur „Kernbildung“ gerechnet werden soll, oder ob es sich empfiehlt, zwischen Differenzierung der Zellen und fertigem „Kern“ ein Stadium einzuschalten, das der Vermehrung und chemischen Differenzierung der Intercellularsubstanz vorbehalten ist (osteoides und chondroides Stadium).

Mit der Differenzierung, „Kernbildung“ und Schalenknochenbildung sind die funktionellen Leistungen des knochenbildenden Apparats aber noch nicht erschöpft. Eine weitere wichtige Phase ist die Resorption. Die Resorption von Knochen innerhalb normaler Grenzen gewährleistet die Erhaltung der Form des Knochens oder besser die Ähnlichkeit der Form zu allen Zeiten der Entwicklung und des späteren Lebens trotz

dauernder Vermehrung der Knochensubstanz. Obwohl die Resorption zur Vernichtung von Knochensubstanz führt, muß sie als eine wichtige (wenn nicht die wichtigste) positive Leistung des knochenbildenden Apparats angesehen werden. Um einen Vergleich zu brauchen: auch die Tätigkeit des Bildhauers ist in bezug auf das Ergebnis eine positive Leistung; auch er vernichtet Material, um die Form, die ihm vorschwebt, zu bilden.

Ausgehend vom undifferenzierten mesenchymalen Gewebe können wir somit einstweilen vier funktionelle Phasen der normalen Knochenentwicklung unterscheiden:

1. Die Differenzierung, 2. die „Kernbildung“, 3. die Schalenknochenbildung und 4. die Resorption, als eine Phase, die zu jeder Zeit dazwischen geschoben werden kann.

Unter Zugrundelegung dieser 4 Phasen soll an Hand des vorliegenden Falles versucht werden, das Wesen der Osteodystrophia fibrosa zu klären. Dazu gilt es herauszufinden, inwiefern diese Phasen quantitativ oder qualitativ gestört sind.

### III. Die Störungen der funktionellen Phasen bei der Osteodystrophia fibrosa.

#### a) Der Schalenknochen.

Ein Rückblick auf die am vorliegenden Fall erhobenen Befunde zeigt, daß die Bildung des Schalenknochens fast ganz zum Stillstand gekommen ist. Schon FUJII berichtet: „Die Zahl der HAVERS'schen Systeme und HAVERS'schen Kanäle ist stark verringert.“ Dieselben Beobachtungen machten PAGET, BUTLIN und ROBERTS-COHEN. Sieht man die schmalen osteoiden Säume am Balkenwerk der Spongiosa als Neubildung von unverkalktem lamellösen Knochen an (MOLINEUS, GOULD, TENHOLM), so kann man höchstens sagen, daß eine ganz geringe Menge an Schalenknochen gebildet ist (MARX), die außerdem qualitativ mindertiert zu sein scheint. Diese Tatsache steht in Übereinstimmung mit Befunden, die ich an einem Fall der adulten, menschlichen hyperostotischen Form der Osteodystrophia fibrosa erheben konnte. Es konnte damals an Schliffbildern — besonders im polarisierten Licht — eindeutig gezeigt werden, daß an den Stellen des Höhepunktes der Erkrankung keinerlei Osteone zur Ausbildung gelangten (WEBER: 1927, . 479, Abb. 22 und Tafel VII, Fig. 1). Der gesamte Querschnitt der corticalis bestand aus kurzen Mosaikstücken von Faserknochen, die sich in einem Raum durchflochten. Dieser Befund konnte besonders durch die Beobachtung unter dem Gipsplättchen Rot I. Ordnung erhärtet werden.

Wenn im vorliegenden Fall noch reichlich lamellöser Knochen vorhanden ist, so ist daraus zu schließen, daß die Erkrankung erst ver-

hältnismäßig kurze Zeit besteht, wofür an sich schon das jugendliche Alter des Tieres spricht, und daß vor dem Beginn der Erkrankung normaler Schalenknochen gebildet wurde. Daß das Skelett bei Ostitis fibrosa früher normal war, berichten schon PAGET und STILLING. Würde dieses Tier älter geworden sein, so daß man von einer PAGET'schen Erkrankung sprechen könnte, dann würden vermutlich auch — wenigstens an den besonders stark befallenen Stellen — die letzten Reste des Schalenknochens abgebaut sein. Es würde dann auch beim Tier dasselbe Bild entstehen, wie ich es beim Menschen an An- und Dünnschliffen zeigen konnte. Wir haben es also bei den von mir beobachteten Fällen mit einer Erkrankung des knochenbildenden Apparats zu tun, die in einer Unvermögen besteht, die höchste Einheit der Knochensubstanz, das Osteon oder den Schalenknochen, zu bilden. Es sind entweder keine Osteoblasten vorhanden, oder sie können die ihnen zugeschriebene Funktion nicht ausüben.

Seitdem sich allgemein die Ansicht durchgesetzt hat, daß die Osteoblasten und Osteoklasten verschiedene Funktionsformen desselben Gewebes darstellen (BAST, WEIDENREICH, CHRISTELLER), erscheint es von Bedeutung festzustellen, in welcher Weise die Funktion des resorptiven Anteils in seiner Beziehung zum Schalenknochen gestört ist. Die vorliegenden Befunde lassen klar erkennen, daß überall eine starke Steigerung der resorptiven Tätigkeit gegenüber dem Schalenknochen vorliegt. Sowohl in der subchondralen Zone im Endost als auch ganz besonders auf der periostalen Seite finden sich Zeichen gesteigerten Abbaus. Seitdem wir mit WEIDENREICH annehmen, daß ein funktioneller Unterschied in der Entstehung von endostalem lamellösen und periostalem lamellösen Knochen nicht besteht, nimmt es uns nicht Wunder, daß der Knochen vom Endost und Periost in gleicher Weise der Resorption anheimfällt.

Als nächste Frage bleibt zu entscheiden, was für ein Gewebe füllt die entstandenen Hohlräume aus? Es sei gleich hier betont, daß Schalenknochen in sie hinein jedenfalls nicht abgelagert wird.

## b) Die „Kerne“.

### 1. Der Faserknochen.

Ehe in die Erörterung über die Entwicklung und das Vorkommen von Faserknochen bei der Osteodystrophia fibrosa eingegangen wird, soll in Kürze die Frage der Metaplasie, der Umprägung von Bindegewebe in Knochen, behandelt werden:

Der Faserknochen WEIDENREICH's entsteht durch Verkalkung oder Verknöcherung von Bindegewebe. Schon WEIDENREICH hat betont, daß es sehr schwer, ja unmöglich ist, zu sagen, ob es sich dabei nur um eine Verkalkung oder um eine richtige Verknöcherung handelt. Er hat sich dann über diese Frage hinweggesetzt und, da morphologisch kein Unterschied zu b



stehen scheint, mit einem gewissen Recht Verkalkung und Verknöcherung in demselben Sinne gebraucht. M. E. liegt gerade hierin die Schwierigkeit und zugleich der Hauptpunkt des ganzen Problems der Metaplasie von Bindegewebe in Knochen. Wir werden hier vermutlich so lange im Dunkel bleiben, bis es möglich sein wird, verkalkte und verknöcherte Substanz technisch-histologisch besser unterscheiden zu können als gegenwärtig. Aus diesem technischen Unvermögen heraus erklärt sich wohl auch die unterschiedliche Ansicht der Autoren in der Metaplasiefrage. Einstweilen sind wir wohl in bezug auf das vorliegende Problem gezwungen, Verkalkung und Verknöcherung gleichzusetzen.

Wo auch immer im Organismus eine zwischen Bindegewebszellen auftretende Intercellularsubstanz verkalkt, müßte es also zur Bildung von „Faserknochen“ kommen können (kalkige Degeneration HARVEY's). Dieser Ansicht ist vielfach widersprochen worden: So bezweifelt GRUBER, daß bereits differenzierte Bindegewebszellen zu Knochenzellen werden können.

In Erkenntnis der technischen Schwierigkeiten habe ich den Ausdruck „Faserknochen“ auszuschalten versucht und dafür die Bezeichnung „Kern“ eingeführt. Sowohl ein verkalktes wie auch ein verknöchertes Bindegewebe stellen für die spätere Ablagerung von Schalenknochen einen solchen „Kern“ dar.

Vollzieht sich der Vorgang der „Kernbildung“ in Organen oder an Stellen, an denen eine Knochenbildung normalerweise nicht vorkommt, so mag man sie mit „metaplastischer“ oder besser „heterotoper Kernbildung“ bezeichnen. Der Hauptton bei dieser sog. „metaplastischen“ Kernbildung liegt m. E. in einer aktiven Tätigkeit der Intercellularsubstanz. Diese Ansicht vertreten auch zwei französische Autoren, LERICHE und POLICARD. Ihre Monographie: „Les problèmes de la physiologie normale et pathologique de l'os“, ist mir zurzeit leider nicht zugänglich. Aus ihrem amerikanischen Referat übersetze ich folgende Sätze: „Knöcherne Metaplasie kann in allen Typen von Bindegeweben vorkommen . . . . Die Umformung von Bindegewebe in Knochen ist eine Erscheinung, die von jeder cellulären Tätigkeit unabhängig ist. Es handelt sich vielmehr um einen interstitiellen und humoralen Prozeß.“ Eine andere Ansicht vertritt z. B. ROHDE, der auf Grund sehr umfangreicher Untersuchungen im Tierexperiment an der LEXER'schen Klinik zu dem Ergebnis kommt, daß es eine Metaplasie zwar nicht gibt, daß vielmehr die heterotope Knochenbildung von unbenutzt liegenden geliebten Mesenchymzellen herrührt (desgl. v. SEEMEN).

Wie ist diese Verschiedenheit der Meinungen zu erklären? M. E. dadurch, daß wir eben zwischen Verkalkung und Verknöcherung nicht streng unterscheiden vermögen, und vielleicht auch dadurch, daß die französischen Autoren von der „Kernbildung“ und ROHDE von der „Schalenknochenbildung“ sprechen.

Ich habe diese Frage der metaplastischen Knochenbildung in einer früheren Arbeit kurz behandelt (1928). Wir müssen bei den sog. „metaplastischen“ oder heterotopen Knochenbildungen unterscheiden zwischen ihrem „Kern“ und der anschließenden Vergrößerung des „Kernes“ durch Schalenknochen. Der „Kern“ kann — und wenn er noch so klein ist — ohne Tätigkeit besonderer Zellen im Sinne der französischen Autoren entstehen. Es finden sich keine Osteoblasten in Reihen, ihre Zellen zeigen keine Steilstellung, kein basophiles Plasma, keinen basalen Kern. Sie erscheinen morphologisch passiv. Aus der im ASCHOFF'schen Lehrbuch von M. B. SCHMIDT



(1928, II, S. 187, Fig. 132) gegebenen Abbildung sind diese Verhältnisse klar ersichtlich.

Der Ausdruck „Kern“ kann lediglich in morphologischem Sinn gebraucht werden. Die Grundsubstanz des „Kernes“ kann eine hyaline oder kollagene Substanz sein oder ein Fettkalk im Sinne ASCHOFF's. Auch verkalktes Bindegewebe um eine Blutung kann einen solchen Kern darstellen (ROSENSTIRN). Über die chemische Zusammensetzung sagt der Ausdruck „Kern“ also nichts Bestimmtes aus, doch liegt in dem Worte „Kern“ der Begriff einer gewissen Festigkeit. Ehe also die Intercellularsubstanz nicht einen gewissen Grad von Härte erreicht hat, kann die Bezeichnung „Kern“ nicht angewandt werden. Ein schönes Beispiel für diese „Kernbildung“ findet sich in dem von WEGELIN geschriebenen Kapitel „Schilddrüse“ im Handbuch von HENKE-LUBARSCH. Dort wird auf S. 216—217 die Verknöcherung in Strumen als ein typisches Beispiel einer heterotopen, metaplastischen Ossifikation aus Bindegewebe abgehandelt. Es tritt zunächst ein verkalktes Bindegewebe auf („Kern“). Eine Vergrößerung dieses „Kernes“ erfolgt durch die Ablagerung von lamellösem Knochen (s. WEGELIN S. 217), dessen Bildung von der Gegenwart oder der Tätigkeit von Osteoblasten abhängig ist. Die Bildung von Schalenknochen kann daher nur dort vor sich gehen, wo ein Gewebe vorhanden ist, das die Osteoblasten zu stellen vermag. In diesem Punkte muß ich ROHDE und VON SEEMEN beipflichten. Ein solches Gewebe ist zweifellos das Gefäßsystem mit den Gefäßwandzellen (HERZOG) und das undifferenzierte mesenchymale Gewebe überhaupt. Der „Kern“ wird vaskularisiert, und es wird Knochen (d. h. Schalenknochen) auf ihn abgelagert (BORST).

Findet die „Kernbildung“ in einem Bereich statt, in dem Knochenbildung normalerweise schon vorkommt, so ist der Ausdruck „Metaplasie“ überhaupt zu verwerfen. Ich spreche hier nicht von der viel umstrittenen Frage der Umprägung von Knorpel in Knochen, die nach v. EBNER und LANG eine Nebeneinander, aber nicht eine Umwandlung ineinander darstellt, und von deren Vorkommen man sich nach BORST schwer überzeugen kann, sondern vom Auftreten des Faserknochens nach soeben beschriebener Modus. Dabei handelt es sich nicht um die Umprägung eines fertigen Gewebes in ein anderes, sondern um das Aufleben eines ortsverwandten Keimgewebes (LUBARSCH), das nur in seiner Entwicklung nicht den Höhepunkt erreicht, sondern auf einer niedrigeren Stufe, dem „Kern“ bzw. Faserknochen, stehen bleibt. Der Ausdruck „fibroblastische“ Knochenbildung ist dann vorzuziehen. Dafür sind vor CHRISTELLER bereits BAUER, GRUBE u. A. eingetreten.

Im vorliegenden Fall wurde eine „metaplastische“ bzw. heterotop Knochenbildung nicht beobachtet. Eine fibroblastische Knochenbildung („Kernbildung“) wurde hingegen in allen untersuchten Knochen festgestellt. Sie ist typisch für die Osteodystrophia fibrosa. Aus den soeben angeführten Gründen sollte daher auch der Ausdruck metaplastisch Malacie, mit dem v. RECKLINGHAUSEN die Ostitis fibrosa bezeichnet hat, besser vermieden werden (CHRISTELLER).

Eine fibroblastische Knochenneubildung wurde besonders an denjenigen Stellen beobachtet, an denen vorher Schalenknochen zur Resorption gelangt war.

Die von der vermehrten Intercellularsubstanz eingeschlossenen Zellen verhalten sich durchaus passiv. Es liegt also eine Initiative der Intercellularsubstanz vor, die alles umschließt, was in ihrem Ausbreitungsfeld gelegen ist (s. STUMPF: Fig. 17 und Tafel V, Abb. IV). So ist an einigen Stellen meiner Präparate sogar der Einschluß roter Blutkörperchen deutlich sichtbar.

Die Neubildung überschreitet im allgemeinen die Norm. In den Pseudotumoren der Kiefer erreicht sie ihren Höhepunkt. Es wird nicht Wunder nehmen, wenn die Faserknochenbildung dort am stärksten und mit besonderer „Vorliebe“ zur Ausbildung kommt, wo sie als ortszuständige Bildung normalerweise schon vorkommt. Solche Orte sind die bindegewebig vorgebildeten Knochen und die Sehnenansätze. Schon REHN und INGIER haben auf diese Bevorzugung bindegewebiger Knochen hingewiesen.

Die Verdickung des Schädeldaches ist bedeutend (Abb. 5). Sie ist bei der hyperostotisch-porotischen Form geradezu zum diagnostischen Zeichen geworden, besonders deswegen, weil auch das Röntgenbild einen typischen Befund liefert (FRANGENHEIM, HURWITZ, SISK, L. PICK, PHILIPS u. A.). Wir finden das verdickte Schädeldach seit PAGET's Veröffentlichung, der sogar den dazu gehörigen Hut abbildete, als besonderes Kennzeichen in den Lehrbüchern der Pathologie (ASCHOFF, KAUFMANN, KNAGGS) und in zahlreichen Arbeiten (FUJII, KOCH, CHRISTELLER u. A.). Wird der ganze Schädel einschließlich des Gesichtsschädels ergriffen, so ergibt sich die sog. Leontiasis ossea VIRCHOW's (KOCH, BOCKENHEIMER, BOIT, CHRISTELLER) und bei den Affen das Pseudogundu (CHRISTELLER), das vermutlich mit dem echten tropischen Gundu oder Anakhré (MARFAN, M. MAYER, FRANGENHEIM) nichts zu tun hat (dagegen: ZIEMANN). Natürlich soll nicht gesagt sein, daß schlechthin alle Hyperostosen des Gesichtes mit Osteodystrophia fibrosa identisch sind (HUTTER).

Die Neubildung von Faserknochen an der Außenseite der langen Röhrenknochen erfordert eine besondere Betrachtung. Der Faserknochen ist dort in Buchten eingebaut, die vorher durch Resorptionsvorgänge am amellösen Knochen entstanden sind. Die Fasern verlaufen in Richtung des Muskelzuges. Bis zu einer bestimmten Stelle sind sie bereits gut verkalkt, dann folgt eine osteoide Zone, die wie „ausgefranst“ in das Periost übergeht. Es entsteht ein Bild, wie es WEIDENREICH für die Verkalkung von Sehnen beschrieben hat. Der Unterschied gegenüber den normalen Verhältnissen am Sehnenansatz liegt darin, daß unter normalen Verhältnissen eine Resorption des Sehnenansatzes von innen her erfolgt, und daß von innen her, von seiten des Endostes, der Ersatz durch Schalenknochen stattfindet. Die normalerweise zwischen den neuen Osteonen liegenden Reste des Faserknochens stellen den Wurzelstock von GEGENBAUR dar. Im vorliegenden Fall aber erfolgt umgekehrt die

Resorption von der Außenseite, wofür der Verlauf der Kittlinie mit nach außen gerichteten Kavitäten den Beweis liefert. Der Ersatz erfolgt in Form von Faserknochen von außen (STILLING). Dadurch, daß die Faserknochenbildung das normale Maß überschreitet, kommt es zur Verdickung des Knochens, zur hyperostotischen Form.

Im Zusammenhang mit der vermehrten Faserknochenbildung sind noch kurz auf jene hyalinen, eosinroten, kernarmen Inseln eingegangen werden, die sich zwischen Periost und Knochen finden. Ich möchte sie nicht ohne weiteres mit dem Faserknochen gleichsetzen; dafür sprechen verschiedene Gründe: Einmal sind in diesen Inseln keinerlei Kernfärberisch darstellbar, weder mit Hämatoxylin noch mit Thionin-Pikrinsäure. Auf der anderen Seite konnten keine Anzeichen richtiger Verkalkung (oder Verknöcherung?) der zweifellos hier vermehrten Interzellularsubstanz festgestellt werden. Diese Gebiete sind daher wohl am besten als Inseln dystrophischer Verkalkung anzusprechen. KLEINMANN sagt ganz allgemein über die dystrophische Verkalkung: „Nach M. B. SCHMIDT ist, das einzig Gemeinsame der angeführten Gewebezustände das Vorhandensein geronnenen kernlosen Protoplasmas oder derber Zwischensubstanz, also eines mehr oder weniger homogenen, of vollkommen hyalinen Substrats.“ GERLACH konnte bei generalisierte Osteodystrophia fibrosa einen ähnlichen Befund erheben. Er fand an der Rippe nach der Pleura zu derbes sklerotisches Schwielen Gewebe, das im ganzen als „kernarm zu bezeichnen ist und an ein Keloid erinnert“. Vielleicht gehen diese Inseln von derselben Stufe aus, von der der Faserknochen entsteht, ohne jedoch dessen Vollkommenheit zu erreichen und sollten daher besser unter dem Kapitel der Differenzierungsstörungen abgehandelt werden. Im vorliegenden Fall stellen diese Inseln jedenfalls eine Art Osteophyt dar und tragen dazu bei, den Knochen als Ganze zu verdicken.

Bei dem jetzt zu besprechenden Abbau des Faserknochens muß unterschieden werden zwischen der Resorption des ursprünglichen und des neugebildeten Faserknochens. Sehr auffällig ist die Tatsache, daß besonders die Sehnenansätze, wo sich normalerweise Faserknochen findet der lakunären Resorption anheim gefallen sind. Darüber hat schon REHN sowie CONE berichtet. CONE beobachtete (s. seine Fig. 7) eine Resorption von außen und einen Neubau von „metaplastischem“ Knochen außen in der Sehne. Auch in meinem Fall konnte durch das Befallen sein sowohl der Ecken des Schulterblattes, als auch des Beckens und der langen Röhrenknochen, eine Bevorzugung gerade dieser Stellen der Sehnenansätze eindeutig festgestellt werden.

Auch der neugebildete Faserknochen wird durch lakunäre Resorption wieder abgebaut. Sowohl in den Kiefern als auch an den langen Röhrenknochen außen am Periost und innen in der sub- und superchondrale



Zone finden sich an den gerade entstandenen Inseln fibroblastischer Knochenneubildung Riesenzellen in ungeheurer Zahl.

## 2. Der Knorpel.

Die am Knorpel erhobenen Befunde ergeben keinen Anhaltspunkt für eine besondere Störung der Knorpelentwicklung. Höchstens erscheint bemerkenswert, daß bei dem immerhin  $8\frac{1}{2}$  Monate alten Hund überhaupt noch so viel Knorpelsubstanz erhalten ist. Im übrigen erscheint der Knorpel gut verkalkt. Besondere Störungen am Säulenknorpel finden sich nicht, mit Ausnahme einer leichten Verdrückung der Säulen. Die von der Epiphysenlinie losgelösten Reste sind ebenfalls gut verkalkt. Auffallend ist, daß auf diese Reste ein lamellöser Knochen nur in ganz geringer Menge und dann nur als schmales Osteoid abgelagert ist. Ob die Schuld dafür dem „Knorpelkern“ zugeschrieben werden soll, wage ich nicht zu entscheiden. Es wäre immerhin möglich, daß die Ablagerung von Schalenknochen nicht stattfinden kann, weil eine Störung — vielleicht chemischer Art — im Knorpel selbst stattgefunden hat. Daß die morphologisch faßbaren Knorpelstörungen überhaupt so gering sind, hat wohl seinen Grund darin, daß das Tier zu Beginn der Erkrankung bereits ein Alter erreicht hat, in dem das Knorpelsystem eine untergeordnete Rolle spielt.

Auch der Knorpel unterliegt der Einwirkung erhöhter Tätigkeit der Osteoklasten. Besonders sinnfällig ist die Resorption in den superchondralen Zonen, in denen reichlich Knorpel durch Riesenzellen zerstört wird.

## c) Die Differenzierung.

Die Frage, ob eine Vermehrung oder Verminderung von Zellverbänden vorhanden ist, die in Richtung auf die Bildung von Knochen unipotent eingestellt sind, ist verhältnismäßig leicht zu beantworten. Zweifellos ist das beim vorliegenden Fall beobachtete fibröse Gewebe im Bereich des Endostes und Periostes ein solches bereits differenziertes Bindegewebe, das die Potenz in sich trägt, Faserknochen zu bilden, d. h. die Aufnahme von Intercellularsubstanz zu gestatten und ihre nachfolgende Erhärtung zum „Kern“ zuzulassen. Dieses Gewebe findet sich sowohl in den Pseudotumoren der Kiefer als auch in den durch Resorption entstandenen Lücken in der superchondralen Zone, in den aufgesplitterten Spongiosabalken des Warzenfortsatzes und des Brustwirbels. Diese Phase des knochenbildenden Systems ist derart gesteigert, daß die Erkrankung mit Recht durch das Beiwort „fibrosa“ charakterisiert ist.

Auch dieses vermehrte differenzierte Gewebe unterliegt der Resorption. Es wird, wie die Befunde lehren, geradeso gut von Riesenzellen resorbiert wie der Knochen selbst. Sehr häufig liegen nämlich die Riesenzellen



mitten in dem fibrösen Markgewebe, ohne daß unmittelbare Beziehungen zum Knochen bemerkbar sind.

#### d) Das undifferenzierte, mesenchymale Gewebe (Grundstufe).

Außer der Vermehrung des soeben erwähnten unipotenten, bereit nach der Richtung auf die Knochenbildung hin differenzierten Gewebe findet sich vor allem an den Höhepunkten der Erkrankung noch ein viel jüngeres, wesentlich niedriger differenziertes Gewebe, das außer der Fortentwicklung zu Faserknochen noch eine Reihe weiterer Möglichkeiten der Differenzierung zuläßt. Dieses pluripotente Keimgewebe (HERZOG stellt nach MÖNCKEBERG in den bei der Osteodystrophia fibrosa auftretenden Pseudotumoren einen mesenchymalen Schwamm dar. Auch das Auftreten des dem embryonalen Bindegewebe ähnelnden Gerüstmarkes muß im Sinne einer Vermehrung der „Grundstufe“ gedeutet werden.

Beide, Gerüstmark und mesenchymaler Schwamm der Pseudotumoren fallen in höchstem Maße der Resorption anheim.

#### e) Die Resorption.

Wir haben gesehen, daß Resorptionsvorgänge, die das normale Maß überschreiten, die einzelnen Phasen der funktionellen Entwicklung des knochenbildenden Apparates unterbrechen. Es läßt sich dabei eine gewisse Bevorzugung der Grundstufe (mesenchymales Gewebe) feststellen. Ferner sind Unterschiede in bezug auf den Ort, an dem die stärksten Resorptionen stattfinden, bemerkbar. Solche bevorzugten Stellen sind die Orte erhöhter mechanischer Reizung. Überall dort, wo Sehnen einstrahlen, finden sich gerade an dieser Stelle des Muskelzuges die aller stärksten Resorptionen, so am Warzenfortsatz, am Schulterblatt, der Symphyse und an den langen Röhrenknochen (REHN, INGIER). Ihre Höhepunkte erreichen die Resorptionsvorgänge in den Pseudotumoren der Kiefer.

### IV. Das Wesen der Osteodystrophia fibrosa.

#### a) Das Wesen im allgemeinen.

Aus der Summe der Störungen der einzelnen Phasen des funktionellen knochenbildenden Apparates läßt sich das Wesen der generalisierten Osteodystrophia fibrosa als Systemerkrankung erkennen.

Zum besseren Verständnis und zur Erklärung seien die Entwicklungsphasen des Knochensystems mit den Entwicklungsstadien der Leukocyten im blutbildenden System verglichen:

Bei manchen Infektionskrankheiten finden wir bekanntlich die Zahl der Leukocyten durch Reizung des Systems enorm erhöht. Die „Nachfrage“ nach leukocyitären Elementen kann so groß werden, daß der Organismus sein

letzten Reservekräfte mobil macht. Die Anzahl der stabkernigen Leukocyten und der Jugendformen ist dadurch stark vermehrt. Trotz der Leukocytose kommt aber die höchste Stufe, der gelapptkernige Leukocyt, im Verhältnis zur Gesamtzahl nur in geringer Menge zur Ausbildung. Wir sprechen dann von einer „Linksverschiebung“ des Blutbildes.

Daß ich bei dem hier erwähnten Vergleich das Verhalten der Leukocyten bei Infektionskrankheiten gewählt habe, geschah lediglich deswegen, weil der Ausdruck „Linksverschiebung“ hierbei am geläufigsten ist. Es soll also damit nicht etwa gesagt sein, daß die Osteodystrophia fibrosa eine Infektionskrankheit ist oder auf Grund einer Entzündung entsteht.

In Analogie zu dem Blutbild möchte ich das Knochenbild der Osteodystrophia fibrosa mit Reizung und Linksverschiebung des funktionellen knochenbildenden Apparats bezeichnen. Die Reizung äußert sich im „überstürzten“ An- und Abbau, oder vielleicht nur allein im Abbau. Die Linksverschiebung tritt in Erscheinung dadurch, daß die höchste Stufe, der Schalenknochen, nicht oder kaum noch zur Ausbildung gelangt, und daß dafür die jüngeren Stadien in starker Vermehrung auftreten, als nächste Vorstufe: der Faserknochen, als jugendliche Vorstufe: das fibröse Gewebe und als jüngste Stufe (Grundstufe): das mesenchymale Gewebe (Gerüstmark und Schwamm der braunen Tumoren).

In der Pathologie ist eine Erkrankung bekannt, bei der ebenfalls ein Unvermögen vorliegt, Schalenknochen zu bilden, die Osteogenesis imperfecta<sup>1)</sup>. Hierbei liegen die Verhältnisse aber insofern anders, als diese Erkrankung sehr früh auftritt oder gar angeboren ist, d. h. niemals vorher ist es zur Bildung von lamellösem Knochen gekommen. Darum wird diese Erkrankung als primäre Dystrophie des Parablasten (SIEGMUND-WEBER) oder als genuine Entwicklungshemmung des Knochensystems aufgefaßt (M. B. SCHMIDT, SCHMORL). Bei dem vorliegenden Fall von Osteodystrophia fibrosa hat aber die Bildung von Schalenknochen vor Beginn der Erkrankung ordnungsmäßig stattgefunden, wofür die übrig gebliebenen Reste von Schalenknochen Beweise darstellen. Man könnte daher hier von einer sekundären Dystrophie des Parablasten in bezug auf die Schalenknochenbildung sprechen.

Die Beziehungen der Osteogenesis imperfecta zur Osteodystrophia fibrosa sind von größtem Interesse für das Otokleroseproblem. Sie wurden erst jüngst wieder von BRUNNER in Verbindung mit dem Morbus GAUCHER hervorgehoben. Auch im otoklerotischen Herd finden sich, wie besonders die Arbeiten von MANASSE, POLITZER, WITTMACK, O. MAYER u. A. gezeigt haben, fibröses Mark, Faserknochen, Riesenzellen und niemals — wenigstens zu Anfang — lamellöser bzw. Schalenknochen. Das histologische Bild der otoklerotischen Herde hat eine große Ähnlichkeit mit dem der Osteodystrophia fibrosa (O. MAYER).

Bei der Osteodystrophia fibrosa wird die Vernichtung von Schalenknochen und das Unvermögen seiner Wiederherstellung ausgeglichen, kompensiert oder unterkompensiert durch die Neubildung von Faser-

<sup>1)</sup> Ein eigener Fall von Osteogenesis imperfecta, bei dem diese Verhältnisse klar zum Ausdruck kommen, soll in Kürze veröffentlicht werden, vermutlich in „Archives of Pathology“.

knochen. Aus diesen Veränderlichen ergeben sich die Unterschiede der hyperostotischen gegenüber der hypostotischen Form.

Wir haben gesehen, daß alle Phasen des knochenbildenden Systems durch lakunäre Resorptionsvorgänge unterbrochen werden können. Im Falle einer solchen Resorption ergibt sich — vielleicht allein schon aus mechanischen Gründen — eine erhöhte Nachfrage nach Stützsubstanz deren Neubildung um so größer sein wird, je größer der Abbau ist. Bevor der Faserknochen in die Erscheinung tritt, füllt sich die Lücke mit fibrösem Gewebe. Vermutlich ist aber dieses fibröse Gewebe ebenfalls nicht das erste, mit dem die Lücke sich schließt. Da es in bezug auf die Knochenentwicklung als Abkömmling des Mesenchyms anzusehen ist, so erfolgt m. E. die primäre Deckung des Defektes mit undifferenzierten Mesenchymzellen, die wahrscheinlich ebenso wie die Riesenzellen zu dem Gefäßsystem in engsten Beziehungen stehen (HUEK, HERZOG u. A.). Von diesen Mesenchymzellen aus erfolgt dann die Rückdifferenzierung in fibröse Zellen und Faserknochen. Die Reparation wird aber nur einsetzen können, wenn dem knochenbildenden System dazu die Fähigkeit geblieben ist, wie das bei der hyperostotischen Form auch tatsächlich der Fall ist. In dieser Reparationsfähigkeit liegt der wesentlichste Unterschied gegenüber dem Skorbut und den Osteoporosen.

Das Gerüstmark ist bei der Osteodystrophia fibrosa im Sinne der Mobilisation der letzten Kräfte, als Ausdruck der höchsten „Linksverschiebung des knochenbildenden Apparats“ aufzufassen, von dem aus, als einem differenzierungsfähigen Mesenchym die Reparation ausgeht.

Beim Skorbut aber fehlt diese Fähigkeit der Reparation; es ergibt sich durch Weitergehen der Resorption eine Osteodystrophia rareficans. Das Gerüstmark des Skorbutis ist somit der Ausdruck höchster Erschöpfung des knochenbildenden Systems. Beide Formen von Gerüstmark haben also eine verschiedene Bedeutung, wenn auch kein histologischer Unterschied vorzuliegen braucht. Sollte bei einem heilenden Skorbut eine Phase der Reparation einsetzen, so dürften sich — abgesehen von der hämorrhagischen Diathese — Bilder ergeben, die einer Osteodystrophia fibrosa ähnlich sind.

Zusammenfassend ergibt sich für die Pathogenese der Osteodystrophia fibrosa: Das Wesen der generalisierten Osteodystrophia fibrosa ist als eine „Reizung und Linksverschiebung des knochenbildenden Apparats“ aufzufassen. Auf einen unbekannten Reiz antwortet das funktionelle knochenbildende System mit Resorption. Zur Deckung des Defektes werden die Reservekräfte mobil gemacht bis zur mesenchymalen Grundstufe (Gerüstmark). Von dort aus erfolgt die Reparation durch Differenzierung in 1. fibröses Mark und 2. Faserknochen. Die höchste Stufe der Schalenknochen kommt nicht mehr oder nur als qualitativ minderwertige Bildung (Osteoid) zur Entwicklung.

Die Unterschiede in den einzelnen Bildern des gleichen Falles er



klären sich: 1. durch mechanische Momente und 2. durch die genetischen Beziehungen, die die einzelnen Phasen des funktionellen knochenbildenden Apparates zu den erkrankten Gebieten besitzen.

### b) Die Pseudotumoren.

Die im vorliegenden Fall an den Kiefern beobachteten Auftreibungen machen eine Stellungnahme zur Epulisfrage erforderlich. Zuvor sollen kurz die in der Literatur niedergelegten Erkenntnisse aufgeführt werden, die ich als Voraussetzung den Betrachtungen zu Grunde lege:

Die bei der generalisierten Osteodystrophia fibrosa zuweilen auftretenden braunen Tumoren sind Mitteldinge zwischen „entzündlichen“ Neubildungen und Blastomen (LUBARSCH, GAUGELE, MÜNCKEBERG, PICK, KONJETZNY, LANGENSKIÖLD). Sie sind ihrer Natur nach ein mesenchymaler Schwamm (MÜNCKEBERG, KONJETZNY). Die Frage, ob sie nur auf dem Boden einer Osteodystrophia fibrosa entstehen können, ist noch nicht völlig geklärt.

Die gutartigen intraossösen Epuliden NÉLATON's sind solche braunen Tumoren (SIEGMUND). Es ist umstritten, ob auf Grund des histologischen Bildes, das für Osteodystrophia fibrosa spricht, genetische Beziehungen zu dieser Erkrankung bestehen.

Der vorliegende Fall am Hund gewinnt dadurch eine besondere Bedeutung, daß neben einer generalisierten Osteodystrophia fibrosa des Skeletts ein solcher brauner Tumor in Gestalt einer intraossösen Epulis vorhanden ist (Abb. 4). Auf Grund dieses Falles läßt sich demnach nicht die Frage lösen, ob die Epulis und die braunen Tumoren auch ohne generalisierte Osteodystrophia fibrosa auftreten können. Wohl aber stellt dieser Fall einen Beitrag dar zur Frage der Pathogenese und Natur der braunen Tumoren bzw. der Epulis und ihrer genetischen Beziehungen zur Osteodystrophia fibrosa.

Wenn man davon ausgeht, daß das Mesenchym die Grundstufe in der Entwicklung des Knochengewebes darstellt (HUECK), und daß diese Grundstufe bei der Osteodystrophia fibrosa in erhöhtem Maße durch Reizung des knochenbildenden Apparats in Erscheinung tritt, woraus bei gleichzeitig erhöhter Nachfrage nach knochenbildenden Elementen als Folge der Resorption die „Linksverschiebung des Knochenbildes“ resultiert, dann muß man den mesenchymalen Schwamm der braunen Tumoren als höchsten Grad der Linksverschiebung auffassen.

Die Hohlräume dieses Schwammes sind mit Blut gefüllt. Es finden sich nur wenige geschlossene Gefäße. Das Gewebe hat in seiner Gesamtheit etwas „milzähnliches“ (Abb. 7). Die Begrenzung der sinusartigen Blutseen nach den „Trabekeln“ aus fibrösem Gewebe und Faserknochen ist nicht scharf. Die vorliegende „intraossöse Epulis“ besteht nun nicht nur aus blutgefülltem Mesenchym, sondern es haben sich bereits Vorgänge der Differenzierung eingestellt. Eine solche progressive



Neigung gehört zum Wesen der Osteodystrophia fibrosa (MARTENS, PICK). Die Differenzierung bewegt sich in erster Linie in normaler Richtung mit dem Ziel: Knochenbildung. Es entwickelt sich fibröses Gewebe und Faserknochen. Der Natur des Mesenchyms entsprechend verläuft diese Differenzierung jedoch nicht nur in dieser einen Richtung mit dem Ziel: Knochen. Es ist vielmehr deutlich erkennbar, daß noch eine Reihe von anderen Gewebsformationen entstehen, die sich aus der Pluripotenz des aufgetretenen Keimgewebes erklären. Da sind die zahlreichen Gefäßsprosse zu nennen, deren Bedeutung bereits von LUBARSCH, MÖNCKEBERG und KONJETZNY hervorgehoben wurde, dann die Riesenzellen und die zahlreichen myeloischen Elemente. Aus allen diesen Produkten der ersten Differenzierung ergibt sich ein sehr wechselvolles Bild. Wäre die Entwicklung hier abgeschlossen, so könnte man die Gesamtheit als Granulationsgewebe bezeichnen.

Merkwürdigerweise — und das ist das Bedeutsame bei den Epuliden und braunen Tumoren — macht die Entwicklung dieser differenzierten Gebilde an dieser Stelle nicht halt. Sie schreitet weiter fort, und zwar in sehr eigenartiger Weise. Schon MARTENS und PICK haben betont, daß bei der Osteodystrophia fibrosa zwar eine progressive Neigung besteht — wie wir das soeben gesehen haben —, daß diese Neigung bei der Osteodystrophia fibrosa aber mit einer regressiven Neigung Hand in Hand geht.

Es soll nun am vorliegenden Fall unter Hinzuziehen der Literatur festgestellt werden, wie die einzelnen Teile sich weiter entwickeln, und welche regressiven Veränderungen sie dabei durchmachen. Aus Gründen, die später ersichtlich werden, soll das Schicksal der Gefäßsprosse unter dem Kapitel „Cysten“ abgehandelt werden.

Die Entwicklung der freien Blutzellen zu verfolgen, würde zwar von allergrößtem Interesse sein, den Rahmen dieser Arbeit aber überschreiten. Andererseits ist es unmöglich, am Parlodionschnitt die hierzu nötigen Einzelheiten überhaupt zu erkennen (DOWNEY). Es wäre denkbar, daß die „Reizung“ des knochenbildenden Systems auch zu einer Reizung des blutbildenden Systems führt. In diesem Sinne erscheint mir das Vorkommen der myeloischen Elemente verständlich. Allem Anschein nach treten diese myeloischen Zellen jedoch nicht in die freie Blutbahn über. So fand wenigstens ROSENÖ das Blutbild bei der Ostitis fibrosa unverändert.

Die in einigen Organen, besonders in der Milz und den Halslymphknoten beobachteten Endothelzellenstränge sind vielleicht auf eine Reizung des retikulo-endothelialen Apparates zurückzuführen. Aus dem weiteren Studium dieser Verhältnisse würden sich zweifellos bedeutungsvolle Beziehungen zu der sog. „Endotheliosen“ sowie zum Morbus GAUCHER ergeben.

Es blieben uns demnach im wesentlichen diejenigen Gewebsformationen zu besprechen, die sich in der Richtung auf das fibröse Gewebe und der Faserknochen fortentwickeln. Ehe in die Verfolgung der einzelnen Differenzierungsprodukte eingegangen wird, erscheint es notwendig, zuvor einige prinzipielle Fragen im allgemeinen zu erörtern.

Es muß die Möglichkeit zugegeben werden, daß aus einem mesenchymalen Gewebe sich ein echtes Blastom entwickeln kann. In diesem Zusammenhang dürfte ein Hinweis auf die Versuche über die experimentelle Geschwulsterzeugung von Wichtigkeit sein:

Die Versuche über Transplantation embryonalen Gewebes (ASKANAZY, JARELL, FISCHER, EBELING u. A.) haben gezeigt, daß sich im allgemeinen kein echter Tumor entwickelt, sondern nur dann, wenn außer dem Transplantat gleichzeitig bestimmte Reizstoffe hinzugefügt wurden. Läßt man diese Reizstoffe weg, so entsteht fast niemals ein echtes Blastom. Erst kürzlich wieder hat SKUBISZEWSKY zu dieser Frage Stellung genommen. In dem Bestreben, einen Beitrag zur COHNHEIM'schen Lehre von der Entstehung der Geschwülste zu liefern, injizierte er Gewebe vom Hühnerembryo in ein erwachsenes Huhn. Der Erfolg war der, daß er zwar eine Weiterdifferenzierung dieses embryonalen Gewebes erhielt, aber keinen Tumor. Er kommt zu dem Schluß, daß auf diese Weise das Problem der Tumoren nicht gelöst werden kann, weil den ersprengten Zellen der „Charakter“ der Bösartigkeit fehlt, das implantierte Gewebe frei von pathologischen Eigenschaften ist. Was hat SKUBISZEWSKY erzeugt? Meiner Ansicht nach ist es ihm gelungen — ohne daß er es erwähnt — einen sehr wertvollen Beitrag zur Frage der Epulis zu erbringen. Betrachtet man seine Abb. 2 und 8, so sollte man glauben, Bilder vor sich zu haben, die aus einem solchen braunen Tumor stammen. Jedenfalls konnte ich — soweit man nach den Abbildungen und den Erläuterungen im Text schließen kann — derartige Stadien der Differenzierung mesenchymalen Gewebes bei dem vorliegenden Fall am Hund beobachten. Nach SKUBISZEWSKY wächst das implantierte Gewebe eine Zeitlang. Es differenziert sich nach allen möglichen Richtungen, u. a. auch in der Richtung nach Knorpel und Knochen. Die Tendenz zur Weiterentwicklung verläuft aber dann im Sande. Man könnte auch sagen, sie „verpufft“. Es kommt also weder zu einer normalen Entwicklung noch zu einem Tumor, sondern zu einer Fehldifferenzierung.

Eine solche Fehldifferenzierung haben wir m. E. auch in der beim vorliegenden Fall beobachteten intraossösen Epulis vor uns. Ehe also ein echtes Blastom zur Ausbildung kommt, „verpufft“ die aufgeflackerte, aggressive Neigung des pluripotenten mesenchymalen Gewebes und macht hier regressiven Platz. Es entsteht eine Fehlbildung (KONJETZNY), für die ich die Bezeichnung Hamartoplasie vorschlagen möchte.

Das Wort Hamartom (ALBRECHT) würde zu nahe Beziehungen zum Blastom ausdrücken und wird auch wohl im allgemeinen für angeborene Fehlbildungen gebraucht, während andererseits der Ausdruck Prosoplasie von PROSU bereits benutzt wurde, um das Wesen einer nach Abschluß der Wachstumsperiode vom Mesenchym ausgehenden in der Mamma aufgetretenen Lidgegewebigen Mischgeschwulst zu charakterisieren.

Die fibromähnlichen Stellen in der „Epulis“ des vorliegenden Fall stellen solche Fehldifferenzierungen dar. Durch mehr oder wenig starke Untermischung mit Riesenzellen und Verdichtung der fibrösen Anteile entstehen Bilder, die einem Fibrosarkom oder Riesenzellensarkom sehr ähnlich sehen. Zwar haben die Zellen nicht eine derartige Unreife wie bei den echten Tumoren, es dürfte aber selbst einem in diesen Dingen sehr bewanderten Pathologen oft kaum möglich sein, daraus für den Kliniker so wichtige Frage „bösaartig?“ oder „gutaartig?“ oder „Tumor überhaupt?“ zu entscheiden, besonders dann nicht, wenn ihm nur ein kleines Stückchen zur Untersuchung vorgelegt wird. Daraus erklärt sich auch der erbitterte Streit, der um die Natur dieser Neubildungen geführt wurde. Es ergibt sich daraus für die Praxis die Forderung, in solchen Fällen bei der Probeexzision besonders große Stücke zu entnehmen (LEXER, REIMANN), denn man darf nicht vergessen, daß auch echte Riesenzellensarkome am Kiefer vorkommen können (BLOODGOOD, REINHARDT).

Eine eingehende Untersuchung der weiteren Umgebung dieser sarkomähnlichen Gebiete fördert im vorliegenden Fall eine weitere Fehlbildung zutage. Es sind das die bei der Befundaufnahme mit „fibroblastischen Faserknochen“ bezeichneten Trabekel. Zwar finden sich Spangen, die in morphologischer Hinsicht vollständig einem echten Faserknochen gleichen, doch zeigen einige von ihnen eigentümliche Abweichungen: Es kommt nämlich auf dem Boden einer vermehrten osteoiden Interzellularsubstanz zu einer Art Konkrementbildung. Die Grundsubstanz verkalkt nicht gleichmäßig wie beim richtigen Faserknochen. Sie weist vielmehr eine krümelige Beschaffenheit auf, als ob kleinste Kalkteilchen körnig ausgefallen wären. Schon LANGENSKIÖLD hat diese Bildungen beobachtet und sie als „konkrementartigen Knochen“ angesprochen. Ich möchte sie als Produkte der Fehldifferenzierung ansehen. Sie sind der Ausdruck der die Osteodystrophia fibrosa beherrschenden regressiven Tendenz, die an dieser Stelle weder einen normalen Faserknochen noch einen echten Knochentumor entstehen ließ.

Eine weitere solche Fehlbildung ist das Auftreten von faserknochenähnlichem Gewebe unter dem Periost. Ich habe diese Stellen bei der Befundaufnahme als Stellen dystrophischer Verkalkung bezeichnet. Sie wurden bereits von KONJETZNY beobachtet und als regenerative Fehlbildungen und Überschußbildungen erkannt, etwa dem Keloid vergleichbar. Auch WÜLFING bezeichnet diese osteoiden Hyperplasien unter dem Periost als eine Art von Fehlbildung. Wenn wir uns vorstellen, daß an diesen Stellen unter dem Periost eine Tendenz des differenzierten Mesenchyms, Faserknochen zu bilden, bestanden hat, daß diese Tendenz aber vorzeitig verpufft ist, dann sind diese hyalinen Inseln dystrophischer Verkalkung wohl am treffendsten als „verpuffter Faserknochen“ anzusprechen.

Der konkrementartige Faserknochen innerhalb des braunen Tumors



und die Inseln verpufften Faserknochens unter dem Periost sind m. E. sehr wichtige und bedeutungsvolle diagnostische Merkmale für die Osteodystrophia fibrosa. Bei einem echten Knochentumor haben wir solche regressiven Bildungen wohl kaum zu erwarten.

Daß sich auch echte Blastome aus dem mesenchymalen Gewebe und aus den Hamartoplasien entwickeln können, ist bekannt (KUROSU, FEDDER, CHRISTELLER, MARTENS, PICK). Ihr Zustandekommen würde auf Grund der experimentellen Arbeiten (CARREL, FISCHER u. A.) vielleicht von dem Vorhandensein besonderer Stoffwechselbedingungen (Reizstoffe, Vitamine usw.) oder auch von unbekannten endogenen Bedingungen abhängig sein, über deren Natur wir vorläufig noch wenig wissen.

In der Regel steht offenbar die bei der Osteodystrophia fibrosa vorliegende Stoffwechselkonstellation der Weiterentwicklung der differenzierten Gebilde zu echten Tumoren entgegen. Es erscheint daher berechtigt, eine Epulis, bei der sich das Bild der Osteodystrophia fibrosa mit den für sie typischen Fehldifferenzierungen findet, als gutartig zu bezeichnen.

Da die braunen Tumoren eine Mittelstellung zwischen echten Blastomen und entzündlicher Neubildung einnehmen, ist es von Wichtigkeit in bezug auf den vorliegenden Fall, die Frage ihres „entzündlichen“ Charakters zu erörtern.

Es ist bekannt, daß das entzündliche Granulationsgewebe ebenfalls ein sehr differenzierungsfähiges Mesenchym enthält, das zu hohen reparativen Leistungen fähig ist. Man hat daher die sog. Epulis mit Granulationstumor bezeichnet und auch die braunen Tumoren als chronisch entzündliche Neubildungen aufgefaßt (GAUGELE). Ob diese Ansicht berechtigt ist oder nicht, hängt in erster Linie von der Definition des Entzündungsbegriffes ab, den man der Betrachtung zugrunde legt. Wenn man mit LUBARSCH den NEUMANN'schen Satz anerkennt: „Es gibt zwar keine Entzündung ohne Regeneration, wohl aber eine Regeneration ohne Entzündung“, dann ist es nicht notwendig, für die Entstehung der braunen Tumoren unter allen Umständen eine chronische Entzündung anzunehmen.

Ist der primäre unbekannte Reiz z. B. eine Stoffwechselstörung, wie weiter unten ausgeführt werden soll, so ist die Annahme einer „Entzündung“ für die Erklärung der Pseudotumoren bei der Osteodystrophia fibrosa zu umgehen.

Zusammenfassend ergibt sich für das Wesen der auf dem Boden der Osteodystrophia fibrosa entstandenen braunen Tumoren: Der höchste Ausdruck der bei der Osteodystrophia fibrosa beobachteten Linksverschiebung des Knochenbildes ist der mesenchymale Schwamm, der den braunen Tumoren bzw. der intraoässösen Epulis zugrunde liegt. Von dort aus erfolgt die Regeneration, das Aufflackern einer neuen



Differenzierung, deren progressive Neigung aber verpufft und einer regressiven Platz macht. Der Erfolg ist eine Fehldifferenzierung (Hamartoplasie).

### c) Die Cysten.

In den „braunen Tumoren“ (Epulis) der Kiefer kommt es beim vorliegenden Fall zu ausgedehnter Cystenbildung. Es liegt nahe, die Natur und Entstehung dieser Cysten mit den Resorptionsvorgängen innerhalb der braunen Tumoren in Verbindung zu bringen. So hat sich LUBARSCHE geradezu als „Aufsaugungsneubildungen“ bezeichnet.

Eine kritische Darstellung des Schrifttums über die Knochencysten und ihre Beziehungen zur Osteodystrophia fibrosa findet sich in der ausgezeichneten Abhandlung von STENHOLM aus dem PICK'schen Institut. STENHOLM stellt fest, daß die fibröse Osteodystrophie die bisher einzige bewiesene Grundlage für die Entstehung von Knochencysten abgibt. Als Ursache für die Cystenbildung sind nach STENHOLM von den verschiedensten Autoren folgende Vorgänge angeführt worden: 1. Blutungen, 2. Erweichung des pathologischen Gewebes und 3. Blutung und Erweichung. Wer hierin tatsächlich der Grund für das Auftreten der Cysten liegt, darzulegen müssen, sagt STENHOLM, außer den fertigen Cysten auch Anfangsstadien vorkommen, unregelmäßige, zuerst spaltartige Hohlräume. Wäre eine Blutung das Primäre, so würde man als Anfangsstadium einen spaltartigen Hohlraum erwarten. Entstehen aber die Cysten durch Einschmelzung, dann müßten sich zunächst ebenfalls unregelmäßige, schabegrenzte Hohlräume bilden. „Solche Anfangsstadien“, schreibt STENHOLM, „konnte man aber niemals beobachten“. Er lehnt daher die von den Autoren angeführten Ursachen für die Cystenbildung ab.

Durch die Untersuchung der bei meinem Fall in den „braunen Tumoren“ der Kiefer beobachteten Cysten (Abb. 10, 11) bin ich in der Lage, zu dieser gewiß sehr schwierigen Frage einen Beitrag zu liefern.

Abb. 7 zeigt im oberen Teil des Präparats zackige, spaltartige Hohlräume, die durch die nach allen Seiten hin wirkende Tätigkeit der Riesenzellen entstanden sind. Da infolge der mehr oder weniger starren Umgebung diese Hohlräume nicht zusammenfallen können, sind wohl ähnliche Bedingungen gegeben wie bei den Cysten des Hirns (BENEKE). Im Gegensatz zu STENHOLM konnte ich also an meinen Präparaten jene spaltartigen Hohlräume feststellen (falsche Cysten, EHRLICH). Es erscheint mir durchaus möglich, daß in diese Hohlräume hinein Blutungen stattfinden können, woraus sich dann später Cysten zu entwickeln vermögen.

Außerdem ist aber noch ein anderer Modus der Bildung dieser Cysten gegeben. Es ist das der von STENHOLM angegebene. Dieser Autor kommt auf Grund seiner Untersuchungen zu dem Schluß, daß die Cysten-

bildung bei fibröser Osteodystrophie ihren Ursprung anscheinend von erweiterten Venen bzw. Lymphgefäßen nimmt.

Es handelt sich in meinem Fall um verhältnismäßig kleine Cysten von Erbsengröße und kleiner, so daß ich der Forderung LEXER's, in solchen Fällen die Umgebung zu untersuchen, leicht nachkommen konnte. Da sich in den von mir untersuchten Präparaten eine ungeheure Menge von Cysten in allen möglichen Stadien befindet, so konnte ich mir ein laufendes Bild ihres Werdegangs machen.

Ich komme bezüglich der Natur dieser Cysten zu einer ähnlichen Ansicht wie STENHOLM, nur möchte ich statt von erweiterten Venen von venösen Sinus (RITTER) sprechen, ein Ausdruck, der mir in Betracht der Auffassung der braunen Tumoren als eines mesenchymalen Schwamms den Verhältnissen besser gerecht zu werden scheint. Es würde sich dann die Entstehung der Cysten etwa folgendermaßen darstellen:

Zweifellos findet sich in dem „braunen Tumor“ ein starker Blutreichtum. Es wird infolgedessen nicht Wunder nehmen, wenn sich in dem Schwamm stark blutgefüllte blindsackartige Sinus bilden (v. HABERER, LANK, HÄUPL, LOOSER). Durch den Zug der Resorptionserscheinung in der Umgebung werden sich diese Säcke ballonartig ausrunden (v. RECKLINGHAUSEN), besonders dann, wenn etwa ein Stauungsdruck als unterstützendes Moment von innen her wirksam ist. Dieser Blutsack (v. HABERER) hat zunächst gegenüber den bindegewebigen Trabekeln keine geschlossene Endothelauskleidung (RIBBERT, FRANGENHELM). Dafür geben zahlreiche Stellen in meinen Präparaten den Beweis. Die Begrenzung geschieht entweder durch eine fibroblastisch entstandene Knochenspange oder durch mehr oder weniger dichtes oder lockeres Bindegewebe. Dieses Bindegewebe ist seiner Natur nach sehr jung und steht auf einer sehr niedrigen Stufe der Differenzierung (MÖNCKEBERG). Daraus entwickelt sich im weiteren Verlauf ein Endothel (s. die Gefäßbildung bei HUECK), das den Sack auskleidet, zuerst nur an einigen Stellen, später in größerer Ausdehnung (BLAUDEL). Die Abb. 11 würde etwa diesem Stadium entsprechen. Stellt man sich nun vor, daß der Hals dieses Kolbens, der die Verbindung mit dem strömenden Blut herstellt, durch fibröse Wucherungsprozesse der Umgebung oder neugebildeten Faserknochen abgeklemt wird, so würde eine blutgefüllte Cyste entstehen. Ob diese Cyste allseitig von Endothel ausgekleidet sein wird, hängt von den Vorgängen in der Umgebung ab. Die Neigung ist zweifellos da. Sie kann auch durch die Natur des umgebenden Gewebes, das dem Gefäßsystem nahesteht, ihre „Befriedigung“ finden. Daß tatsächlich die Auskleidung oder Umkleidung der Cyste stattfindet, dafür ergeben meine Präparate die Stütze, denn die große Mehrzahl der Cysten ist glattwandig (LANGENSKIÖLD) und mit einem Endothel ausgekleidet (echte Cyste, EHRLICH). Das bis dahin strömende Blut ist also in der Cyste gefangen. Es wird von dem

Spannungsdruck des Endothels abhängen, ob der Verschuß vollständig ist oder ob Lücken bestehen, die einen weiteren Blutaustausch zulassen (HUECK). An einigen Stellen ist deutlich zu beobachten, daß das Blut gerinnt und später nach Art eines Thrombus organisiert wird (LOOSER). In derartigen Cysten findet man außer den geronnenen, braunroten Blutmassen noch eine mit Hämatoxylin sich himmelblau färbende, feinkörnige, serumartige Masse, die ich z. T. als geronnenes Blutserum, z. T. als das Sekretionsprodukt der Endothelzellen ansehen möchte. Diese Sekretion kann vermutlich soweit gehen, daß ein Innendruck auftritt, der seinerseits zur Vergrößerung der Cyste führt. Solche Stellen habe ich leider nicht beobachten können, vermutlich deshalb nicht, weil es sich um ein junges Tier handelt und alle diese Vorgänge sich mehr im Beginn der Entwicklung befinden als am Ende. Der Grund, warum STENHOLM die „Anfangsstadien“ nicht verfolgen konnte, liegt m. E. darin, daß er außer seinem Fall IX nur vorgerückte Stadien untersucht hat.

Außer der Entwicklung der Cysten aus blutgefüllten Sinus in den Maschen des mesenchymalen Schwamms kommt anscheinend noch ein anderer Modus vor. Schon FUJII, LOTSCH und MEYER haben die Cysten auf eine myxoide Auflockerung, eine Quellung des Gewebes zurückgeführt. Auch ich habe an meinen Präparaten derartige Stellen beobachten können. Ich möchte diese Auflockerung und Quellung als den Beginn einer Lymphraumbildung ansehen, die ja nach HUECK durchaus in dieser Weise verlaufen kann. Ist aber erst einmal ein lymphgefüllter Sinus vorhanden, dann kann in diese Räume ebenfalls ein Bluteintritt erfolgen. Der weitere Verlauf der Cystenbildung ist dann ähnlich dem zuvor für den Blutsinus beschrieben.

Diese soeben geschilderte Entwicklung der Cysten kann zu jeder Zeit, in jeder Phase, durch die sich in der Umgebung abspielenden Vorgänge gestört werden. Zweifellos kann von außen her eine Resorption in die Cystenwand stattfinden, ehe die Endothelauskleidung fertiggestellt ist oder auch dann, wenn bereits eine wahre Cyste sich geformt hat. Von benachbarten Cysten oder von den blutgefüllten Sinus kann durch die Bresche erneut Blut in die alte Cyste einströmen.

Ebensogut wie in eine alte Cyste kann aber das Blut auch in eine der eingangs erwähnten, durch Riesenzellen entstandenen, spaltartigen Höhlen einströmen, deren Wandung womöglich noch von solchen Riesenzellen ausgekleidet ist. Es erscheint mir — wie gesagt — durchaus möglich, daß beim Zusammenwirken der soeben beschriebenen Prozesse auch daraus eine Cyste sich bilden kann.

Die Cysten können also auf Grund des vorliegenden Falles hervor gehen aus:

1. Spalträumen, entstanden durch Resorption mit nachfolgender Durchblutung,



2. blutgefüllten Sinus,
3. lymphgefüllten Sinus.

Was ist das Gemeinsame dieser drei Entstehungsarten?

Erinnern wir uns daran, daß in dem Kapitel „Pseudotumoren“ von der Fehldifferenzierung gesprochen wurde, die von dem mesenchymalen Schwammgewebe des braunen Tumors ausgehend für die Osteodystrophia fibrosa typisch ist! Es blieben die aus den Gefäßsprossen entstehenden Fehlbildungen zu erörtern: Daß die Riesenzellen als abortive Gefäßsprosse anzusehen sind, wurde schon von KONJETZNY ausgesprochen. Durch ihre Tätigkeit entstehen die Spalträume innerhalb der braunen Tumoren (1).

Aus Anlagen der Blut- und Lymphgefäße können sich zweifellos echte Tumoren, Hämangiome und Lymphangiome, entwickeln (BORST). Zu einer solchen Tumorbildung kommt es aber im vorliegenden Fall nicht, ebenso wenig wie zu einer richtigen Blut- und Lymphgefäßbildung, sondern eben zu Fehlbildungen der in Richtung auf das Blut- (2) und Lymphgefäßsystem (3) eingestellten Elemente. Als solche „Hamartoplasien“ möchte ich auch die Cysten ansehen, als Ausdruck der für die Osteodystrophia fibrosa typischen Neigung zu Fehldifferenzierungen (vgl. SKUBISZEWSKI Abb. 8).

Bei der Entstehung der Cysten innerhalb der braunen Tumoren wirken neben der Neigung zu Fehlbildungen offensichtlich noch drei Faktoren Hand in Hand: Die Resorption, die fibröse Neubildung sowie die Neubildung von Faserknochen, als diejenigen Phasen des knochenbildenden Systems, die sich — wie wir sahen — bei der Osteodystrophia fibrosa allgemein als gesteigert erwiesen. Daß außerdem die Stauung noch eine Rolle spielt, erscheint sehr wahrscheinlich (POMMER, BAUER, LANG), und daß gerade bei diesen Formen der intraossösen Epuliden der Traumaakt als mechanisches Moment (v. RECKLINGHAUSEN, BAUER) von Bedeutung ist, dürfte kaum zweifelhaft sein.

## V. Der Verlauf der Osteodystrophia fibrosa.

### a) Der Ausgangspunkt.

Bei der Frage nach dem Beginn der Osteodystrophia fibrosa muß scharf unterschieden werden zwischen der Frage: 1. welcher Teil des funktionellen knochenbildenden Apparats erkrankt zuerst, und 2. wo beginnt die Erkrankung örtlich? Wir müssen also den funktionellen Ausgangspunkt von dem örtlichen trennen. Daß beide in gewisser Beziehung zueinander stehen, geht aus dem über das Wesen der Osteodystrophia fibrosa Gesagten hervor.



### 1. Der funktionelle Ausgangspunkt.

Zwei Ansichten stehen sich hier gegenüber: Die Einen (CORRO WHITE u. A.), sehen in der Resorption oder in der Bereitschaft des Knochens zur Resorption (SIEGMUND) das primäre und die Anderen der fibrösen Markwucherung (L. PICK). Wie können wir diese beiden Ansichten in Einklang bringen?

Da, wie wir gesehen haben, die vermehrte Resorption ebenso wie die fibröse Gewebswucherung Leistungen des funktionellen knochenbildenden Systems darstellen, so muß meiner Ansicht nach die Frage nach dem funktionellen Ausgangspunkt heißen: Welcher Teil des knochenbildenden Systems antwortet auf einen unbekannten Reiz sowohl im Sinne einer Resorption als auch im Sinne einer Vermehrung des fibrösen Gewebes?

Nach der heutigen Ansicht stammen die Riesenzellen von den Gefäßwandzellen ab (HERZOG). Damit sind die nahen Beziehungen zum Mesenchym gegeben. Wir sahen ferner, daß das fibröse Gewebe (als Stadium der Differenzierung) ebenfalls als Abkömmling des Mesenchyms anzusehen ist. Es würde somit als letztes Glied der Kette eine Reizung des differenzierungsfähigen mesenchymalen Gewebes, der Grundstufe des knochenbildenden Systems, vorliegen.

### 2. Der örtliche Ausgangspunkt.

Die Frage, ob die Osteodystrophia fibrosa ihren Ausgang vom Endost oder vom Periost nimmt, ist von den Autoren wiederholt erörtert worden. In bezug auf den Menschen berichtet PAGET, STILLIN und v. RECKLINGHAUSEN, daß der Beginn auf der periostalen Seite zu suchen ist (PAGET-Form PICK's). Neuere Untersuchungen von PICK, SCHMORL, CHRISTELLER u. A. weisen indessen darauf hin, daß im allgemeinen die Osteodystrophia fibrosa vom Mark, vom Endost ausgeht (enostale Form PICK's) und von dort unter Auflockerung der Corticalis nach außen führt. v. RECKLINGHAUSEN sagt einmal: „Die Atmosphäre des osteogenen Markes, welche alle Teile der Tela ossea umhüllt, ist der Sitz der ganzen hyperplasierenden Entzündung“.

Wie ein Rückblick auf die Befunde zeigt, ist im vorliegenden Falle der große Markraum im Gebiete der Diaphysen fast unverändert. Die Corticalis aber ist von außen angenagt und aufgelockert. Die Buchten an der Außenseite sind mit fibrösem Gewebe, mit Riesenzellen und Faserknochenneubildungen erfüllt. Im Innern finden sich nicht die geringsten Veränderungen an dieser Stelle. Daraus ist wohl mit Sicherheit zu schließen, daß wenigstens hier der Prozeß von außen ausgeht.

Anders liegen die Verhältnisse in der sub- und superchondralen Zone. Besonders an der superchondralen Zone ist keinerlei Beziehung

zum Periost vorhanden. Die fibröse Umwandlung nimmt hier also ihren Ausgang vom Endost. Auch die tumorförmige, fibromähnliche Auftreibung der Kiefer, die zwischen Zahn und Kieferknochen eingekeilt ist, nimmt zweifellos ihren Ausgang vom Endost.

In diesem Zusammenhange muß auf einen Befund eingegangen werden, der an zwei verschiedenen Stellen beobachtet wurde, das Bild der dissezierenden Atrophie:

Die Aufspaltung eines Spongiosabalkens durch fibröses, riesenzellenhaltiges Gewebe wurde von L. PICK als dissezierende Atrophie bezeichnet und als eine Vorstufe der Ostitis fibrosa hingestellt. Diese Ansicht findet auf Grund der vorliegenden Befunde ihre Bestätigung. Auch JOST und ZUMPE beobachteten ähnliche Verhältnisse beim Pferd. Ebenso beschreibt LANG (1925, Abb. 9 und 1926, Abb. 18) diese dissezierende Atrophie. Er spricht von einem durch Phlegmasie-Druck „ballonähnlich“ aufgetriebenen Resorptionsraum.

An der in meinem Fall im Dornfortsatz des 12. Brustwirbels beobachteten Stelle ist eine Beziehung zum Periost nicht festzustellen. Daß eine solche tatsächlich nicht vorhanden war, läßt sich leider nicht genau sagen, denn es wurden von diesem Wirbel keine Serienschritte ungefertigt, die die etwaigen Beziehungen zum Periost hätten aufdecken können. Ein Eingang in die fibröse Höhle wurde nicht gefunden. Immerhin besteht die Möglichkeit, daß sie ausgehend vom Endost in einer anderen Schnittebene gelegen war. Der Balken liegt im Schnitt ebenfalls weit von der Rinde entfernt und ist allseitig von Lymphmark umgeben.

Der andere Balken mit dissezierender Atrophie liegt im Spongiosagerüst des Warzenfortsatzes. Dort ist — wie oben erwähnt — die Entscheidung noch schwerer zu treffen, denn in den Serienschritten durch das Gehörorgan ließ sich feststellen, daß sowohl zu einem fibrösen Herd unter dem Periost eine Verbindung besteht, als auch durch einen kleinen Kanal zu dem — allerdings normalen — Mark oder besser zu dessen Endost.

Zusammenfassend kann also gesagt werden, daß der örtliche Ausgang der Osteodystrophia fibrosa sowohl im Periost als auch im Endost gelegen sein kann. Beide Wege sind gleichzeitig möglich und finden sich gemeinsam bei dem vorliegenden Fall.

#### b) Der Höhepunkt.

Die Ablagerungen von Faserknochen an der Außenseite der Knochen findet in Hohlräumen statt, die vorher durch Resorptionsvorgänge gebildet wurden (periostale Form). Eine Kittlinie mit nach außen offenen Richten zeigt die Grenze der Neubildung gegenüber dem alten Knochen. Diese periostale Auflagerung verdickt den Knochen als Ganzes. Wird zur gleichen Zeit auch von innen her die alte Corticalis zerstört und durch Faserknochen ersetzt, der aus der fibrösen Markwucherung

hervorgeht, so wird schließlich, wenn die letzten Reste der alten Corticalis vernichtet sind, keine Grenze mehr zwischen dem neugebildeten periostalen und endostalen Faserknochen vorhanden sein. Eine solche Umwandlung würde vermutlich Jahre in Anspruch nehmen. Wir dürfen in ihrem Abschluß den Kulminationspunkt der Osteodystrophia fibrosa sehen, wie er bei der adulten hyperostotisch-porotischen Form, der Osteitis deformans PAGET's, zur Beobachtung gelangt. Wie bereits WILHELM und PICK gezeigt haben, tritt bei der PAGET-Form die Selbständigkeit einer periostalen Auflagerung im Röntgenbild nicht in Erscheinung. Ich hatte Gelegenheit, den im ASCHOFF'schen Lehrbuch (M. B. SCHMIDT: 1928, II. S. 211, Fig. 153) abgebildeten Femur-Knochen aus der Sammlung PICK's an Schliffen zu untersuchen: In der Tat fand sich auch bei diesem Fall von PAGET'scher Erkrankung im proximalen Drittel, an der Stelle der stärksten Verdickung, keine Grenze, die man röntgenologisch oder histologisch hätte nachweisen können. Auf Grund der bei dem vorliegenden Fall am Hund erhobenen Befunde komme ich heute zu dem Schluß, daß bei der PAGET'schen Erkrankung zwar eine stark periostale Beteiligung in Gestalt von neugebildetem Faserknochen vorhanden ist, daß diese periostale Wucherung wegen des Mangels einer Grenze aber gegen das gleichartige von innen kommende Faserknochengewebe nicht getrennt werden kann. Es besteht demnach für unser Auge tatsächlich keine „Selbständigkeit“ der periostalen Wucherung (L. PICK).

Ganz anders liegen die Verhältnisse z. B. bei der diffusen Syphilis des Knochens. Es entsteht bei der Syphilis eine mantelartige Umhüllung (v. RECKLINGHAUSEN) des alten Knochens, die röntgenologisch (PICK) und histologisch (WEBER) durch ihre Selbständigkeit einwandfrei nachzuweisen ist.

Die bei der Syphilis zuerst abgelagerte Schicht bleibt noch sehr lang als ein „Grenzstreifen“ erhalten. Dieser „Grenzstreifen“ ist — wie ich an Schliffbildern, besonders im polarisierten Licht zeigen konnte, ein Schalenknochen, der vermutlich durch die erste Reizung der Osteoblasten durch den Entzündungsprozeß oder durch das syphilitische Toxin zur Ausscheidung gekommen ist. Später wird allerdings auch bei der Syphilis periostaler Faserknochen abgelagert. Aber auf den ersten Reiz erfolgt nicht wie bei der Osteodystrophia fibrosa eine Resorption, sondern eine Apposition von lamellenlösem Knochen.

Darum ist es verständlich, warum bei der Osteodystrophia fibrosa kein Grenzstreifen beobachtet werden konnte. Es bleibt abzuwarten, ob die Osteodystrophia fibrosa stets ohne Grenzstreifen verläuft (s. JOSTES) und inwieweit eine Verallgemeinerung dieser auf ein nicht allzu großes Material gestützten Beobachtungen der Kritik standhält.

### c) Die Ausheilung.

Wenn das Wesen der Osteodystrophia fibrosa mit „Reizung und Linksverschiebung des knochenbildenden Apparats“ gekennzeichnet ist, dann muß folgerichtig die Heilung mit „Aufhören der Reizung



und „relativer Rechtsverschiebung“ gleichbedeutend sein. Die Resorption kehrt in normale Bahnen zurück. Das fibröse Mark wird wieder einem normalen Platz machen. Das sinnfälligste Zeichen der Heilung ist das Wiedererwachen der Fähigkeit des knochenproduzierenden Systems, Schalenknochen zu bilden. Die Hohlräume zwischen dem Faserknochenwerk werden von Schalenknochen ausgekleidet. An Anschliffen und Dünnschliffen habe ich solche Stadien gefunden. Der Erfolg dieser Ausmauerung wird der sein, daß der ausgeheilte Knochen nicht nur verdickt, sondern auch hart und außerordentlich schwer ist. Es entsteht die sklerotische Form. Die Bilder und Beschreibungen, die CHRISTELLER von sklerotischen Affenschädeln gegeben hat, lassen diese Verhältnisse deutlich erkennen. Der zwischen den neugebildeten Osteonen eingemauerte Faserknochen wird, da die Resorption in normale Bahnen zurückkehrt, natürlich noch jahrelang in dem Stadium stehenbleiben müssen, den er zu Beginn der Heilung einnahm. Deshalb wird sich die Verdickung des Knochens während des Lebens wohl kaum zurückbilden. Wie ich an Dünnschliffen zwischen gekreuzten Nikols unter einem Gipsplättchen Rot I. Ordnung beobachten konnte, bestehen die Faserknochenstücke aus sehr kurzen, verflochtenen und verfilzten Fasern, die nach kurzem Verlauf abbrechen. Diese Bruchstücke werden ringsum von Kittlinien begrenzt, die sich mit Hämatoxylin intensiv färben. Die Mannigfaltigkeit und die eigenartige Form der Kittlinien läßt die Bruchstücke als ein Mosaik erscheinen (SCHMORL). Ein solches Mosaik kann nach Angaben SCHMORL's noch jahrelang bestehen bleiben. Bei der sklerotischen Form müssen wir es in den Zwickeln zwischen den neugebildeten Osteonen suchen.

## D. Gedanken über die Ätiologie der Osteodystrophia fibrosa.

### I. Die Stoffwechselstörung.

Die Ätiologie der Osteodystrophia fibrosa ist unbekannt (M. B. SCHMIDT). Die noch 1912 von MARFAN vertretene Ansicht über die Entstehung auf syphilitischer Grundlage kann nicht mehr anerkannt werden. Die neueren Theorien bewegen sich in den verschiedensten Richtungen. Sie sind zu bekannt, als daß sie hier einer Wiederholung bedürften. Ich soll vier Gruppen von Theorien einander gegenübergestellt werden, und anschließend daran den Versuch zu machen, sie unter einem gemeinsamen Gesichtspunkt zusammenzufassen.

Die erste Ansicht über die kausale Genese der Ostëitis deformans stammt von PAGET. Er hält die Erkrankung für die Folge einer chronischen Ostitis. In ähnlicher Weise, doch ohne allzu starke Betonung des „entzündlichen“ Charakters, spricht sich VON RECKLINGHAUSEN aus.



Später wurde mehr das Moment der Stauung in den Vordergrund gestellt (POMMER, LANG, WARSH und OBERHAMMER). Doch sprechen sich MIKULIZC, REHN, L. PICK, CHRISTELLER u. A. gegen die Entzündungs- und Stauungstheorie aus. Die histologischen Befunde in unserem Falle lassen zweifellos, besonders in den braunen Tumoren, eine Hyperämie und Stauung erkennen.

Eine zweite Theorie beschuldigt Störungen der inneren Sekretion entweder einer Drüse (GÜNTHER, SCHOEN, VAN HAZEL, MANDEL, GOLDUKEN) oder mehrerer Drüsen (VON BERGMANN, HOFFHEINZ) für das Zustandekommen der Erkrankung. Besonders wurden Veränderungen in der Schilddrüse und in den Epithelkörperchen gefunden, die von anderer Seite aber als Folge der Erkrankung aufgefaßt wurden (ERDHEIM, KERL) oder überhaupt nicht festgestellt werden konnten. LOTSCH bemerkt hierzu: „Das Problem der Ätiologie der Knochenerkrankung ist durch die Annahme innersekretorischer Störungen in keiner Weise der Lösung näher. Es sei erwähnt, daß bei unserem Tier eine Schilddrüsenveränderung im Sinne einer Hypothyreose gefunden wurde.“

Eine dritte Theorie beschuldigt das Trauma (LANG, FUJII). SIEGMUND gelang es durch künstlich gesetztes Trauma, am Kiefer eine lokale Osteodystrophia fibrosa zu erzeugen. Auf Grund seiner Versuche kommt er zu dem Schluß, daß die Osteodystrophia fibrosa ein Symptomenkomplex ist, der überall dort zur Ausbildung gelangen kann, wo Knochengewebe zur Auflösung kommt. Diese Ansicht vertritt auch R. WEBER. Im vorliegenden Fall findet sich in der Anamnese ebenfalls ein Trauma. Das hochschwängere Muttertier war einige Tage vor dem Partus vom Tische gestürzt.

Eine vierte Theorie hält die Osteodystrophia fibrosa für eine Stoffwechselstörung schlechthin, als Folge einer Ernährungsstörung. Diese Richtung wird von ASCHOFF, REHN, STENHOLM, PICK, CHRISTELLE, BRUNNER u. A. vertreten. Die Beweise hierfür sind aus der Erfahrung gewonnen. Weist doch die Schnüffelkrankheit der Schweine und die Krüschkrankheit der Pferde auf einen Nährschaden hin! CORSON-WHITE berichtet über Stoffwechselversuche an Affen, die an Osteodystrophia fibrosa litten. Sie hält die PAGET'sche Erkrankung ebenfalls für eine Stoffwechselstörung, die durch eine an anorganischen Salzen und Vitaminen ungenügende Nahrung entsteht und zum Alkalinieren führt. Auch im vorliegenden Fall muß der Ernährungsfaktor in Betracht gezogen werden. Der Hund wurde — wie berichtet — nur mit Sprattl „Fibo“ und Tee ernährt, eine gewiß einseitige und unzureichende Nahrung. In derselben Weise deuten auch die Versuche MELLANBY, der bei Hunden Rachitis erzeugt haben will, die aber nach CHRISTELLE — „wie jeder Unbefangene sofort erkennt“ — eine Osteodystrophia fibrosa ist, darauf hin, daß die Osteodystrophia fibrosa beim Tier als Folge eines Nährschadens sich entwickeln kann.

Die verschiedensten Momente sind also als ätiologische Faktoren herangezogen worden. LOOSER spricht in seiner Polemik gegen die Einteilung CHRISTELLER's geradezu davon, daß die Osteodystrophia fibrosa ein Sammelbegriff von allerlei verschiedenen Prozessen ist. Im vorliegenden Fall von generalisierter Osteodystrophia fibrosa konnte merkwürdigerweise für jede der angeführten Theorien eine Stütze gewonnen werden.

Stehen nun die Theorien über die Ätiologie der Osteodystrophia fibrosa zueinander im Widerspruch oder ist es möglich, für sie ein gemeinsames Bindeglied zu finden?

Schon LOTSCH hat nach dem gemeinsamen Faktor der Fälle von generalisierter Osteodystrophia fibrosa gesucht. Er sagt bei Besprechung der Ätiologie: „Es bleiben lediglich Schädlichkeiten, die auf dem Blutwege das gesamte Knochensystem treffen.“ Er meint damit offenbar eine Stoffwechselstörung. Es wäre denkbar, daß durch die allerverchiedensten Momente eine ganz bestimmte Störung des Stoffwechsels hervorgerufen wird, die so beschaffen ist, daß sie als chemische Einheit dem Knochen gegenübertritt und so zum nämlichen Effekt führt. Das Gemeinsame in den vier aufgeführten Theorien ist der Umstand, daß sie alle auf eine Störung des Stoffwechsels hinauslaufen. Ist der Chemismus örtlich in bestimmter und uns unbekannter Richtung gestört, ergibt sich die lokale Form und liegt eine Störung des Gesamtstoffwechsels vor, entsteht die generalisierte Form.

Es steht die Annahme einer lokalen Stoffwechselstörung also nicht im Gegensatz zu der Stauungstheorie, die v. RECKLINGHAUSEN, KOMMER, LANG u. A. vertreten. Denn es wäre doch durchaus möglich, daß eine lokale Zirkulationsstörung die gleiche chemische Auswirkung auf einen scharf umgrenzten Ort zeitigt, wie eine allgemeine Störung des gesamten Stoffwechsels aus irgendeiner anderen Ursache auf das Gesamtknochensystem des Körpers. Ganz allgemein verursachen nach BÜSSLE Veränderungen des Blutes und der Gewebssäfte Störungen in der Kitt- und Binde substanz. Auf dem Wege über den Stoffwechsel könnten also ätiologisch verschiedene Faktoren (L. PICK) zu den nämlichen anatomischen Veränderungen führen.

Wir haben es in bezug auf die Osteodystrophia fibrosa mit ähnlichen Verhältnissen zu tun, wie sie sich bei den Nierenkrankheiten finden. Nach ASCHOFF trennen wir bekanntlich die akuten Nephritiden mit defensivem von den chronischen Entzündungen mit reparativem Charakter. ASCHOFF faßt sie auf dem Boden einer Entzündung entstandenen chronischen Nierenentzündungen und die durch lokale oder allgemeine Stoffwechselstörungen bedingten unter dem Ausdruck chronische Nephropathien zusammen und bezeichnet die auf metabolischer Basis beruhenden Nephropathien mit dem klinischen Ausdruck Nephrosen.

Die Annahme einer chronischen Stoffwechselstörung hat bereits LEHN vom ASCHOFF'schen Institut veranlaßt, in Anlehnung an MIKULICZ

den Ausdruck „Osteodystrophia“ fibrosa einzuführen. In Analogie zu den Nierenerkrankungen könnte man das vorliegende Krankheitsbild als eine „Osteopathie“ auffassen, wie es ALMERINI bereits getan hat. Es würde sich somit um eine Osteopathia fibrosa handeln, wobei allerdings das Wort „fibrosa“ noch nicht wie bei der ASCHOFF'schen Einteilung der Nierenerkrankungen das die Ätiologie charakterisierende Beiwort darstellt, denn die Ursache der Erkrankung ist vorläufig noch unbekannt. Als klinische Bezeichnung für die Osteopathien erscheint der Ausdruck „Osteosen“ geeignet.

## II. Der Wert des Diätversuchs.

Der Wert des Diätversuchs in bezug auf die Klärung der Ätiologie ist ein begrenzter.

Um die Frage der Stoffwechselstörung und ihre Bedeutung für die Ätiologie näher zu beleuchten, sei die Osteodystrophia fibrosa mit einer anderen Osteopathie, der Rachitis, verglichen.

Durch die Untersuchungen vor allem von MCCOLLUM wissen wir, daß sich die Rachitis bei Ratten experimentell durch eine ganz bestimmte Diät erzeugen läßt (STEPP und GYÖRGY). Auf Grund der Arbeiten von WINDAUS HESS u. A. läßt sich die Rachitis durch bestrahltes Ergosterol bei der Ratte und beim Menschen zur Heilung bringen (ARON). Die endogenen Faktoren wie Rasse, Vererbung und Einfluß endokriner Drüsen, die den spontanen Ausbruch begünstigen oder verhindern, kennen wir jedoch noch nicht. SCHLÖSSER hat RABL beobachtet, daß manche seiner Ratten für Rachitis nicht „empfindlich“ waren. Auch wissen wir z. B. nicht, warum von einem menschlichen Zwillingsspaar, das unter den gleichen Bedingungen aufwächst, das eine Kind spontan an Rachitis erkrankt und das andere nicht.

Ähnlich dürften die Verhältnisse bei der Osteodystrophia fibrosa liegen. Die Vitamin-Frage scheidet hier wohl aus, denn sonst würden die lokalen Formen kaum eine Erklärung finden können. Es ist hier vielleicht die örtliche bzw. die allgemeine Gewebsreaktion das Entscheidende. Tierexperimente werden uns darüber Aufschluß geben müssen. Auch wenn es tatsächlich gelingen sollte, das Bild dieser Erkrankung experimentell zu erzeugen, so würden wir über die letzte Ursache der spontanen Erkrankung noch nichts wissen. Die Erklärung hierfür ist darin zu suchen, daß der Stoffwechsel zwischen der unbekannten inneren Ursache und ihrem Effekt am Knochensystem eingeschaltet ist. Die Schwierigkeiten der Frage der Ätiologie liegen darin, daß wir vorläufig noch nicht übersehen, 1. ob bei der Osteodystrophia fibrosa einer oder mehrere Faktoren im Chemismus gestört sind, 2. ob diese Störung durch einen oder mehrere Faktoren exogen erzeugt werden kann und 3. ob eine ganz bestimmte Kombination von endogenen und exogenen Momenten vorliegen muß, damit die generalisierte Form entsteht. Auch bei der



ontanen, lokalen Formen scheinen neben dem Trauma die endogenen Faktoren ebenfalls eine gewisse Rolle zu spielen (LEXER, LOTSCH), sonst wäre es unverständlich, warum trotz der vielen Traumen, die auf die Knochen der Menschen wirken, die lokale Osteodystrophia fibrosa nur so relativ selten zur Beobachtung gelangt.

### III. Die Aufgabe des Diätversuchs.

Trotz der vorhandenen Schwierigkeiten erscheint der Diätversuch besser geeignet zu sein, das Wesen der Stoffwechselstörung zu ergründen, als Versuche mit Trauma, Stauung oder Störung der inneren Sekretion, weil man beim Ernährungsversuch bereits mit ziemlich exakt feststellbaren chemischen Körpern arbeiten und infolgedessen die Wirkung auf den Knochen auch chemisch eher übersehen kann.

Ganz allgemein muß bei derartigen Versuchen festgestellt werden, durch welche Ernährungsfaktoren die einzelnen Phasen des funktionellen knochenbildenden Apparats beeinflußt werden können.

Unsere Kenntnisse darüber sind durch die Versuche, die Rachitis zu erzeugen, bereits ziemlich weit fortgeschritten. Ihr Nutzen für die Pathologie wird leider oft dadurch illusorisch gemacht, daß z. B. der Ausdruck „Rachitis“ ganz allgemein für „Knochenweiche“ gesetzt wird. Besonders von amerikanischer Seite wird das Wort „Rachitis“ vielfach mißbraucht. So behaupten z. B. JONES, SHOHL und BENNET eine Rachitis beim Hund erzeugt zu haben, ohne auch nur den Versuch zu machen, dafür einen histologischen Beweis zu erbringen, geschweige denn, eine Differentialdiagnose gegenüber den anderen malacischen Erkrankungen durchzuführen.

Sollte es tatsächlich gelingen, die einzelnen Diätfaktoren ausfindig zu machen, die den Stoffwechsel in der Art beeinflussen, daß eine Reizung und Linksverschiebung des funktionellen knochenbildenden Apparats ausgelöst wird, dann muß sich m. E. das Krankheitsbild der Osteodystrophia fibrosa ergeben. Auch die Hamartoplasien, die Fehlbildungen aus dem aktivierten Mesenchym, müßten sich erzeugen lassen. Sollte es fernerhin möglich sein, durch eine „entsprechende“ Ernährung die Reizung aufzuheben und eine Rechtsverschiebung zu erreichen, dann müßte die Erkrankung dadurch zur Ausheilung gebracht werden können. Es gilt dabei, diejenigen Faktoren ganz allgemein festzustellen, welche die Ossifikationen zum Stillstand bringen und die Bildung von Schalenknochen verhindern.

### IV. Die Bedeutung des erfolgreichen Diätversuchs für die Praxis.

Der Erfolg solcher Diätversuche auf den Menschen übertragen würde uns wohl kaum zur Entdeckung der Ätiologie führen, wohl aber würde er uns mit größter Wahrscheinlichkeit den Weg weisen, auf dem



die Prophylaxe und Therapie der generalisierten Osteodystrophia fibrosa beim Menschen möglich wäre, in ähnlicher Weise, wie diese Versuch bei der Rachitis bereits zum Erfolg geführt haben.

### Zusammenfassung.

1. Es wird ein Fall der juvenilen, pseudotumor- und cystenbildender hyperostotisch-porotischen Form der Osteodystrophia fibrosa (sog. Ostiitis fibrosa v. RECKLINGHAUSEN) bei einem 8½ Monate alten Bostonterrier mitgeteilt, eine Erkrankung, die beim Hund selten ist.

2. Die Erkrankung gleicht der zur Osteodystrophia fibrosa gehörige Schnüffelkrankheit der Schweine. Die Oberkiefer sind tumorförmig aufgetrieben. Es liegt eine intraossöse Epulis (NÉLATON) mit Ausgang vom Endost des Alveolarknochens vor. In diesem Pseudotumor finden sich zahlreiche Cysten, die z. T. mit einem Endothel ausgekleidet sind. Diese „Epulis“ ist auf dem Boden einer generalisierten Osteodystrophia fibrosa entstanden. Der Pseudotumor bietet nicht nur morphologisch das Bild einer Osteodystrophia fibrosa, sondern steht auch zu dieser Erkrankung in genetischer Beziehung.

3. Von den inneren Organen erweist sich die Schilddrüse im Sinne einer Hypothyreose verändert, während die Epithelkörperchen morphologisch keinen pathologischen Befund bieten.

4. Rachitis, Osteomalacie und die generalisierten Osteoporosen konnten differentialdiagnostisch ausgeschlossen werden. Möglicherweise findet sich jedoch eine geringe skorbutische Komponente. Eine progressive Knochenatrophie (ASKANAZY) wird unter dem Bilde der disseminierenden Atrophie (L. PICK) beobachtet. Sie dürfte in der Tat ein Vorstadium der Osteodystrophia fibrosa darstellen.

5. Zur Klärung der Pathogenese des vorliegenden Falles und der Osteodystrophia fibrosa überhaupt werden die Phasen der normalen Knochenentwicklung nach neuen Gesichtspunkten aufgesucht.

Die einzelnen Stadien des normalen funktionellen knochenbildenden Apparats („Knochen als Organ“) sind ausgehend vom undifferenzierten mesenchymalen Gewebe (Grundstufe): 1. Die Differenzierung, 2. die „Kernbildung“, 3. die Schalenknochenbildung und 4. die Resorption. Zu den „Kernen“ wird der „verkalkte Knorpel“ und das „verkalkte bzw. verknöcherte Bindegewebe“ (Faserknochen) gerechnet. Die „Kerne“ bilden das Fundament für den Schalenknochen („Knochen als Gewebe“). Die Resorption ist eine positive funktionelle Leistung des knochenbildenden Apparats. Sie kann jede der vier Phasen der Entwicklung unterbrechen.

6. Bei der Osteodystrophia fibrosa des vorliegenden Falles wird der Schalenknochen nicht gebildet oder nur als qualitativ minderwertige Substanz (Osteoid). Das Stadium der „Kernbildung“ ist in bezug auf

den Faserknochen gesteigert, während es bezüglich des Knorpels unverändert ist. Das Stadium der Differenzierung ist stark vermehrt (fibröses Gewebe). Auch das undifferenzierte, mesenchymale Gewebe (Grundstufe) tritt sehr stark in Erscheinung (Gerüstmark, Schwamm der „braunen Tumoren“). Die Resorption unterbricht in gesteigertem Maße alle Phasen, richtet sich besonders auch gegen die Grundstufe und erreicht ihren Höhepunkt in den „braunen Tumoren“.

7. Aus dieser Analyse des pathologischen Geschehens ergibt sich: Das Wesen der generalisierten Osteodystrophia fibrosa im allgemeinen ist als eine „Reizung und Linksverschiebung“ des Knochenbildes aufzufassen. Auf einen unbekannten Reiz (Stoffwechselstörung) antwortet das funktionelle knochenbildende System mit Resorption (z. B. dissezierende Atrophie Pick's). Zur Deckung des Defektes werden die Reservekräfte mobil gemacht bis zur mesenchymalen Grundstufe (Gerüstmark und Schwamm der „braunen Tumoren“). Von dort aus erfolgt die Reparation durch Differenzierung in 1. fibröses Gewebe und 2. Faserknochen. Die nächste Stufe, der Schalenknochen, kommt nicht mehr oder nur als qualitativ minderwertige Bildung (Osteoid) zur Entwicklung. Die Unterschiede in den einzelnen Bildern des gleichen Falles erklären sich 1. durch mechanische Momente und 2. durch die genetischen Beziehungen, die die einzelnen Phasen des funktionellen knochenbildenden Apparats an den erkrankten Stellen besitzen.

8. Dieser Ablauf des Geschehens wird durch das Auftreten der Pseudotumoren und Cysten kompliziert. Der mesenchymale Schwamm der Pseudotumoren ist als der höchste Ausdruck der Linksverschiebung anzusehen. Von dort aus erfolgt eine Differenzierung, die sich außer in der Richtung auf den Knochen noch in einigen anderen Richtungen fortsetzt. Dabei kommt es zu einer Reihe von Fehldifferenzierungen, die mit Hamartoplasien bezeichnet werden. Als solche Bildungen sind die innerhalb der „braunen Tumoren“ auftretenden fibromähnlichen Inseln sowie die Inseln konkrementartigen Knochens aufzufassen. Unter dem Periost der langen Röhrenknochen liegen ebenfalls solche Fehldifferenzierungen, die als „verpuffter Faserknochen“ anzusehen sind. Auch die Cysten innerhalb der braunen Tumoren sind als solche Hamartoplasien anzusprechen. Sie gehen vermutlich von den in der Richtung auf das Gefäßsystem eingestellten Elementen aus. Sie können entstehen aus Lücken nach Resorption von Riesenzellen (verpuffte Gefäßprosse) oder aus Blut- oder Lymphsinus (verpuffte Gefäßbildungen).

9. Bei der Entstehung der Cysten innerhalb der „braunen Tumoren“ wirken außerdem noch drei Faktoren Hand in Hand: die Resorption, die fibröse Gewebswucherung sowie die Neubildung von Faserknochen aus diejenigen Phasen des knochenbildenden Systems, die bei der generalisierten Osteodystrophia fibrosa ganz allgemein gesteigert sind. Dabei spielen die Stauung und der Kauakt noch eine unterstützende Rolle.

10. Eine Epulis, bei der sich das Bild einer Osteodystrophia fibrosa findet, muß als gutartig angesehen werden.

11. Der funktionelle Ausgangspunkt der generalisierten Erkrankung ist im differenzierungsfähigen mesenchymalen Gewebe (osteogene Atmosphäre, v. RECKLINGHAUSEN) zu suchen. Der örtliche Ausgangspunkt kann im Gebiet des Periostes oder Endostes gelegen sein. Beide Wege sind gemeinsam möglich. Der Kulminationspunkt der Erkrankung ist erreicht, wenn der Schalenknochen der alten Corticalis vollständig geschwunden und sein Ersatz durch Faserknochen beendet ist. Die Heilung äußert sich im Aufhören der Resorption und in einer relativen Rechtsverschiebung des Knochenbildes, die durch erneutes Auftreten von Schalenknochen in Erscheinung tritt.

12. Die Osteodystrophia fibrosa entsteht vermutlich auf dem Boden einer chronischen lokalen oder allgemeinen Stoffwechselstörung. Diese Ansicht steht nicht im Gegensatz zu den vielen Theorien ihrer Entstehung. Die Erkrankung sollte daher in Analogie zu den Nierenerkrankungen mit Osteopathia fibrosa bezeichnet werden (klinisch Osteose).

13. Zur Lösung der Frage der Ätiologie erscheint der Diätversuch am geeignetsten, um die der Osteodystrophia fibrosa zugrunde liegende Stoffwechselstörung zu klären. Der Wert des Diätversuchs ist jedoch ein begrenzter, weil der Stoffwechsel zwischen einer etwa vorhandenen endogenen Kausa und den Effekt am Knochensystem eingeschaltet ist. Somit könnte die „Empfänglichkeit“ und damit die spontane Entstehung der Erkrankung nicht ohne weiteres erklärt werden.

14. Die Aufgabe des Diätversuchs besteht darin, festzustellen, durch welche Nahrungsstoffe eine Reizung und Linksverschiebung des Knochenbildes verursacht werden kann, und wie die für das Wesen der Osteodystrophia fibrosa so bedeutungsvollen Hamartoplasien erzeugt werden können. Eine Diät, durch die ein „Stillstand der Resorption und eine relative Rechtsverschiebung“ erreicht werden könnte, wäre vermutlich in der Lage, die generalisierte Osteodystrophia fibrosa zur Ausheilung zu bringen.

15. Der Erfolg solcher Diätversuche wäre, auf den Menschen übertragen, von großer Bedeutung für die Prophylaxe und Therapie der generalisierten Osteodystrophia fibrosa.

---



## Literaturverzeichnis.

- 1) ALMERINI, A., Zur Deutung der umschriebenen jugendlichen Formen der „tumorbildenden Ostitis fibrosa (v. RECKLINGHAUSEN'sche Krankheit)“. Zeitschr. f. Krebsforsch., Bd. 7, S. 389, 1909.
- 2) ARNDT, H. J., Über „Epithelkörperchensklerose“ bei einem Schimpansen, zugleich ein Beitrag zur Frage der pathogenetischen Zusammenhänge von Epithelkörperchen und Ostitis fibrosa. Virchow's Arch., Bd. 247, S. 454, 1923.
- 3) —, Die generalisierten Skeletterkrankungen der Haussäugetiere im Lichte neuerer Forschungsergebnisse. Berliner tierärztl. Wochenschr., Bd. 39, S. 539, 1923.
- 4) ARON, H., Moderne Rachitisbehandlung. Klin. Wochenschr., Bd. 7, S. 2444, 1928.
- 5) ASCHOFF, L., Diskussionsbemerkung zu SCHMORL. Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 4, S. 158, 1901.
- 6) ASCHOFF, L. u. KOCH, W., Skorbut. Jena, Fischer, 1919.
- 7) —, „Harnapparat“ in seinem Lehrbuch der pathologischen Anatomie. Jena, Fischer Bd. 2, S. 432, 1928.
- 8) ASKANAZY, M., Über Ostitis deformans ohne osteoides Gewebe. Arbeiten a. d. path. Institut Tübingen, Bd. 4, 1903.
- 9) —, Chemische Ursachen und morphologische Wirkungen bei Geschwulstkranken, insbesondere über sexuelle Frühreife. Zeitschr. f. Krebsforsch., Bd. 9, S. 393, 1910.
- 10) AXHAUSEN, G., Über das Wesen und die diagnostische Bedeutung der v. RECKLINGHAUSEN'schen Gitterfiguren. Zentralbl. f. allg. Path. u. path. Anat., Bd. 19, S. 97, 1908.
- 1) —, Über die bei der Luft- und Gasfüllung des Knochengewebes auftretenden Phänomene und ihre Deutung, insbesondere über die sogenannten „Gitterfiguren“. Virchow's Arch., Bd. 194, S. 371, 1908.
- 2) BAST, T. H., Studies on the structure and multiplication of bone cells facilitated by a new technique. Am. J. Anat., Bd. 29, S. 139, 1921.
- 3) BAUER, W., Über zystische Bildungen im Kiefer. Zeitschr. f. Stomatol., Bd. 25, S. 205, 1927.
- 4) BENEKE, R., Diskussionsbemerkung zu MÖNCKEBERG. Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 7, S. 240, 1904.
- 5) —, Diskussionsbemerkung zu den Vorträgen über Osteodystrophia fibrosa. Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 21, S. 143, 1926.
- 6) v. BERGMANN, E., Ostitis fibrosa und ihre Ausgänge. Arch. f. klin. Chir., Bd. 136, S. 308, 1925.
- 7) BLAUEL, C., Über zentrale Kieferfibrome. Beitr. z. klin. Chir., Bd. 37, S. 306, 1903.
- 8) BLOODGOOD, J. C., Bone sarcoma — Periosteal and diffuse type, and their diagnosis from benign lesions. J. Bone a. Joint Surg., Bd. 8, S. 722, 1926.
- 9) BOCKENHEIMER, Ph., Über die diffusen Hyperostosen der Schädel- und Gesichtsknochen s. Ostitis deformans fibrosa (VIRCHOW's Leontiasis ossea). Arch. f. klin. Chir., Bd. 85, S. 511, 1908.
- 10) BOIT, Über Leontiasis ossea und Ostitis fibrosa. Arch. f. klin. Chir., Bd. 97, S. 515, 1912.
- 1) BORST, M., Pathologische Histologie. Leipzig, Vogel, 1926.
- 2) —, „Das pathologische Wachstum“; in ASCHOFF, Pathologische Anatomie. Jena, Fischer, Bd. 1, S. 611, 1928.
- 3) BRUNNER, H., Über das Vorkommen von Gaucherzellen im Felsenbeine nebst Bemerkungen zur kausalen Genese der Otosklerose. Zeitschr. f. Hals-, Nasen- u. Ohrenheilk., Bd. 22, S. 60, 1928.
- 4) CARREL, A., The mechanism of the formation of sarcoma. J. A. M. A., Bd. 84, S. 1795, 1925.
- 5) —, Lit. siehe: EBELING, A. H.
- 6) CHRISTELLER, E., Die Formen der Ostitis fibrosa und der verwandten Knochenkrankungen der Säugetiere, zugleich ein Beitrag zur Frage der Rachitis der Affen. Ergebn. d. allg. Path. u. path. Anat., Bd. 20, S. 1, 1922.
- 7) —, Über das Gundu der Affen. Berliner Ges. f. path. Anat., Bd. 5, S. 24, 1923.
- 8) —, Referat über die Osteodystrophia fibrosa. Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 21, S. 7, 1926.
- 9) CONE, S. M. Bone pathology in its relation to general pathology. Am. J. orthop. Surg., Bd. 6, S. 607, 1908—1909.
- 10) —, The pathology of osteitis deformans, PAGET's disease. J. Bone a. Joint Surg., Bd. 4, S. 751, 1922.
- 1) CORSON WHITE, E. P., Osteomalacia. Arch. Int. Med., Bd. 30, S. 620, 1922.
- 2) —, Osteitis deformans in monkeys. Arch. Int. Med., Bd. 30, S. 790, 1922.



- 33) DOWNEY, H., The myeloblast; in Cowdry, Special cytology. New York, Hoeber, Bd. 1, S. 371, 1928.
- 34) DUKEN, J., Beitrag zur Kenntnis der malacischen Erkrankungen des kindliche Skelettsystems. Zeitschr. f. Kinderheilk., Bd. 46, S. 114, 1928.
- 35) EBELING, A. H., A ten year old strain of fibroblasts. J. Exper. Med., Bd. 38, S. 755, 1922.
- 36) v. EGGELE, H., Der Aufbau der Skeletteile in den freien Gliedmaßen der Wirbeltiere, Untersuchungen an urodelen Amphibien. Jena, Fischer, 1911.
- 37) EHRLICH, E., Über glattwandige Cysten in Geschwülsten. Beitr. z. klin. Chir. Bd. 37, S. 597, 1903.
- 38) FEDDER, L., Ostitis deformans mit sekundärer Rundzellensarkomatose. Fortsch. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen, Bd. 31, S. 391, 1923.
- 39) FINDLAY, L., The etiology of rickets. Lancet, Bd. 93, S. 956, 1915.
- 40) —, A study of social and economic factors in the causation of rickets. Med. Research Com. Spec. Rep. Series No. 20, London, 1918.
- 41) FISCHER, A., Lit. siehe: EBELING, A. H.
- 42) FRANGENHEIM, P., Die Ostitis fibrosa (cystica) des Schädels. Beitr. z. klin. Chir. Bd. 90, S. 117, 1914.
- 43) —, Familiäre Hyperostosen der Kiefer. Beitr. z. klin. Chir., Bd. 90, S. 139, 1914.
- 44) —, Angeborene Ostitis fibrosa als Ursache einer intrauterinen Unterschenkelfraktur. Arch. f. klin. Chir., Bd. 117, S. 22, 1921.
- 45) —, Korreferat über Die Klinik der Osteodystrophia fibrosa. Verhandl. d. deutsche path. Gesellsch., Bd. 21, S. 49, 1926.
- 46) FOOTE, I. S., Bone as a measure of development. Am. Dent. Ass. Press Douglas Printing Company, Omaha, Nebraska, 1928.
- 47) FRAENKEL, E., Untersuchungen über die MOELLER-BARLOW'sche Krankh. Fortsch. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen, Bd. 7, S. 231 u. 291, 1903—1904.
- 48) —, Untersuchungen über die MÖLLER-BARLOW'sche Krankheit. Fortsch. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen, Bd. 10, S. 1, 1906—1907.
- 49) —, Über die MÖLLER-BARLOW'sche Krankheit (infantiler Skorbut). Münchener med. Wochenschr., Bd. 53, S. 2185 u. 2247, 1906.
- 50) —, Die MÖLLER-BARLOW'sche Krankheit. Fortsch. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen, Ergbd. 18, 1908.
- 51) FRÖHNER, E., Statistische und casuistische Mittheilungen über das Vorkommen und die chirurgische Behandlung der Geschwülste beim Hund. Monatsh. f. prak. Tierheilk., Bd. 6, S. 1, 1895.
- 52) FRÖHNER, E. u. ZWICK, W., Lehrbuch der speziellen Pathologie und Therapie der Haustiere. Stuttgart, Enke, 1915.
- 53) FOX, H., Diseases in captive wild mammals and birds. Philadelphia, Lippincott, 1923.
- 54) FUJII, Ein Beitrag zur Kenntnis der Ostitis fibrosa mit ausgedehnter Cystenbildung. Deutsche Zeitschr. f. Chir., Bd. 114, S. 25, 1912.
- 55) GANS, O., Zur Pathogenese der Knochenwachstumsstörungen. Frankfurter Zeitschr. f. Path., Bd. 16, S. 37, 1915.
- 56) GAUGELE, K., Zur Frage der Knochenzysten und der Ostitis fibrosa v. RECKLINGHAUSEN's. Arch. f. klin. Chir., Bd. 83, S. 953, 1907.
- 57) GERLACH, W., Zur Frage der generalisierten Ostitis fibrosa (unter besonderer Berücksichtigung der Wirkung intensiver Röntgenbestrahlung). Virchow's Arch. Bd. 254, S. 461, 1925.
- 58) GOHDE, H. L., Über Ostitis fibrosa mit einer eigenen Beobachtung am Unterkiefer. Dissert., Jena, 1926.
- 59) GOLD, E., Über die Bedeutung der Epithelkörperchenvergrößerung bei der Ostitis fibrosa generalisata v. RECKLINGHAUSEN. Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Chir. u. Med. Bd. 41, S. 63, 1928.
- 60) GOULD, E. P., The bone changes occurring in v. RECKLINGHAUSEN's disease. Quart. J. Med., Bd. 11, S. 221, 1917—1918.
- 61) GRUBER, G. B., Anmerkungen zur Frage der Weichteilverknöcherungen, besonders der Myopathia osteoplastica. Virchow's Arch., Bd. 260, S. 457, 1926.
- 62) —, „Mißbildungen“; in ASCHOFF, Pathologische Anatomie. Jena, Fischer, 1928.
- 63) GUNKEL, P., Die Zellvorgänge bei der Knochenatrophie (Osteoporose). Virchow's Arch., Bd. 267, S. 204, 1928.
- 64) GÜNTHER, B., Über Epithelkörperchentumoren bei den multiplen Riesenzellensarkomen (braunen Tumoren) des Knochengewebes. Frankfurter Zeitschr. f. Path. Bd. 28, S. 295, 1922.
- 65) GYÖRGY, P., „Rachitis“; in STEPP u. GYÖRGY, Avitaminosen. Berlin, Springer, S. 191, 1927.

- 3) V. HABERER, H., Zur Frage der Knochencysten und der Ostitis fibrosa v RECKLINGHAUSEN. Arch. f. klin. Chir., Bd. 82, S. 873, 1907.
- 7) —, Diskussionsbemerkung zu KONJETZNY: „Die sog. lokalisierte Ostitis fibrosa“. Arch. f. klin. Chir., Bd. 121, S. 150, 1922.
- 8) HÄUPL, K., Zur Kenntnis der sog. Riesenzellensarkome der Kiefer. Vierteljahrsschr. f. Zahnheilk., Bd. 41, S. 449, S. 1925.
- 9) HÄUPL, K. u. LANG, F. J., Die marginale Paradentitis. Berlin, Meußner, 1927.
- 10) HAGER, O., Über einen Fall von Ostitis fibrosa beim Hunde. Diss., Gießen 1919.
- 11) HANSZEL, F., Ostitis fibrosa RECKLINGHAUSEN einer Oberkieferhöhle. Monatsschr. f. Ohrenheilk., Bd. 55, S. 1244, 1921.
- 12) HART, K., Über die experimentelle Erzeugung der MÖLLER-BARLOW'schen Krankheit und ihre endgültige Identifizierung mit dem klassischen Skorbut. Virchow's Arch., Bd. 208, S. 367, 1912.
- 13) HARTMANN, A., Zur Entwicklung des Bindegewebsknochens. Arch. f. mikr. Anat., Bd. 76, S. 253, 1910.
- 14) HARVEY, W. H., Experimental bone formation in arteries. J. Med. Res., NS. Bd. 12, S. 25, 1907.
- 15) VAN HAZEL, W., and ANDREWS, E., Osteitis deformans. Surg. Gynec. Obst., Bd. 45, S. 54, 1927.
- 16) HEBRANT, G., ANTOINE, G., et LIEGEOIS, F., Contribution à l'étude de l'ostéo-arthropathie hypertrophique du chien. Ann. de méd. vét., Bd. 73, S. 289, 1928.
- 17) HEIDSIECK, E., Vergleichend anatomische Antworten auf einige Fragen des Knochenbaus. Deutsche med. Wochenschr., Bd. 54, S. 694, 1928.
- 18) HELLNER, H., Juvenile monostotische tumorbildende Osteodystrophia fibrosa mit seltener Lokalisation. Beitr. z. klin. Chir., Bd. 140, S. 92, 1927.
- 19) HERXHEIMER, G., Krankheitslehre der Gegenwart. Dresden, Steinkopf, Bd. 17, 1927.
- 20) HERZOG, G., Über einen Fall von kindlichem Skorbut; ein Beitrag zur Regeneration des Knochenmarkes. Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 16, S. 346, 1913.
- 21) —, Über die Bedeutung der Gefäßwandzellen in der Pathologie. Klin. Wochenschr., Bd. 2, S. 684 u. 730, 1923.
- 22) HESS, A., zitiert nach STEPP u. GYÖGRY.
- 23) HILL, J. W., The management and diseases of the dog. London, Sonnenschein, 1900.
- 24) HINTZSCHE, E., Die Osteoblastenlehre und die neuere Anschauung vom normalen Verknöcherungsvorgang. Ergebn. d. Anat. u. Entwicklungsgesch., Bd. 27, S. 413, 1927.
- 25) HIRSCH, S., Is generalized osteitis fibrosa (Paget and v. RECKLINGHAUSEN) congenital? Am. J. Surg., Bd. 3, S. 167, 1927.
- 26) HOFFHEINZ, Über die Vergrößerungen der Epithelkörperchen bei Ostitis fibrosa und verwandten Krankheitsbildern. Virchow's Arch., Bd. 256, S. 705, 1925.
- 27) HUECK, W., Über das Mesenchym. Ziegler's Beitr., Bd. 66, S. 330, 1920.
- 28) HURWITZ, S. H., Osteitis deformans, PAGET's disease. Bull. Johns Hopkins Hosp., Bd. 24, S. 263, 1913.
- 29) HUTTER, FR., Über Hyperostosen der Gesichts- und Schädelknochen und die Hyperostosis maxillaris. Monatsschr. f. Ohrenheilk., Bd. 48, S. 197, 1914.
- 30) HUTYRA, FR. u. MAREK, J., Special pathology and therapeutics of the diseases of domestic animals. Chicago, Eger, 1926.
- 31) INGIER, A., Über die bei der Schnüffelkrankheit am Rumpf- und Extremitätenskelett auftretenden Veränderungen. Frankfurter Zeitschr. f. Path., Bd. 12, S. 270, 1913.
- 32) JOEST, E. u. ZUMPE, A., Beitrag zur Kenntnis der Ostitis fibrosa des Pferdes. Zeitschr. f. Infektionskrankh., par. Krankh. u. Hyg. d. Haustiere, Bd. 27, S. 81, 1924.
- 33) JOEST, E., Handbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere. Berlin, Schoetz, Bd. 1, S. 111 u. 116, 1926.
- 34) JONES, M. R., Studies on inorganic salt metabolism I. Proc. Soc. Exper. Biol. a. Med., Bd. 21, S. 199, 1924.
- 35) —, Hydrochloric acid therapy in rickets. J. A. M. A., Bd. 82, S. 439, 1924.
- 36) —, Studies on inorganic salt metabolism in dogs III. Am. J. Physiol., Bd. 79, S. 694, 1927.
- 37) JOST, J. u. KOCH, M., Krankheiten junger Tiere. Handb. d. allg. Path. u. path. Anat. d. Kindesalters v. Brünig und Schwalbe, Bd. 1, 2, S. 546, 1914.
- 38) JOSTES, F. A., Diagnosis and treatment of benign cysts and fibrocystic diseases of bones. J. Bone a. Joint Surg., Bd. 7, S. 251, 1925.
- 39) KAUFFMANN, E., Spezielle pathologische Anatomie. Leipzig, de Gruyter, 1922.
- 40) KERL, F., Zur Frage der Epithelkörperchenhyperplasien bei Osteomalacie und Osteoporosen. Deutsche med. Wochenschr. Bd. 51, S. 1271, 1925.

- 101) KIENBÖCK, R., Über Osteoporose. Fortschr. a. d. Geb. d. Röntgenstrahlen, Bd. 1, S. 862, 1925.
- 102) KIHN, B., in STEPP und GYÖRGY, Avitaminosen. Berlin, Springer, 1927, S. 10.
- 103) KITT, TH., Lehrb. der patholog. Anatomie der Haustiere. Stuttgart, Enke, 1909.
- 104) KLEINMANN, H., Untersuchungen über die Bedingungen der Kalkablagerung tierischen Geweben. Virchow's Arch., Bd. 268, S. 686, 1928.
- 105) KNAGGS, L., On osteitis deformans (Paget disease) and its relation to osteitis fibrosa and osteomalacia. Brit. J. Surg., Bd. 13, S. 206, 1925.
- 106) —, Diseases of bone. New York, William Wood, 1926.
- 107) KOCH, M., Demonstration eines Schädels mit Osteitis deformans PAGET (Leontias ossea VIRCHOW). Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 13, S. 107, 1909.
- 108) KÖLLIKER, A., Handbuch der Gewebelehre. Leipzig, Engelmann, 1899.
- 109) KONJETZNY, G. E., Die sog. „lokalisierte Ostitis fibrosa“. (Ein Beitrag zur Kenntnis der solitären Knochencysten und der schaligen myelogenen Riesenzellensarkome). Arch. f. klin. Chir., Bd. 121, S. 567, 1922.
- 110) v. KORFF, K., zitiert bei HINTZSCHE, E.
- 111) KUROSU, SH., Über eine bindegewebige Mischgeschwulst der weiblichen Brustdrüse. Zeitschr. f. Krebsforsch., Bd. 26, S. 99, 1928.
- 112) LANG, F. J., Über die genetischen Beziehungen zwischen Osteomalacie — Rachitis und Ostitis fibrosa. Virchow's Arch., Bd. 257, S. 594, 1925.
- 113) LANG, F. J. u. HAUPL, K., Beiträge zur Kenntnis der Entstehung der Ostitis fibrosa. Virchow's Arch., Bd. 262, S. 383, 1926.
- 114) —, Über Granulationstumoren. Zeitschr. f. Krebsforsch., Bd. 26, S. 113, 1928.
- 115) LANGENSKJÖLD, F., Über Ostitis fibrosa, Acta chir. Scandinav., Bd. 53, S. 1, 1909.
- 116) LERICHE, R. and POLICARD, A., Some fundamental principles in the pathology of bone. Surg. Gynec. Obst., Bd. 43, S. 308, 1926.
- 117) —, Les problemes de la physiologie normale et pathologique de l'os. Paris, Masson et Cie., 1926.
- 118) LEWIN, H., Knochenmarkskarzinose unter dem Bilde einer dystrophischen Skeletterkrankung. Zeitschr. f. Krebsforsch., Bd. 26, S. 494, 1928.
- 119) LEXER, E., Über die nicht parasitären Cysten der langen Röhrenknochen. Arch. f. klin. Chir., Bd. 81, S. 363, 1906.
- 120) LOBECK, E., Über experimentelle Rachitis an Ratten. Frankfurt. Zeitschr. Path., Bd. 30, S. 402, 1924.
- 121) LOOSER, E., Über die Knochenveränderungen beim Skorbut und bei der BARLOWSCHEN Krankheit. Jahrb. f. Kinderheilk., Bd. 62, S. 743, 1905.
- 122) —, Über die Cysten und braunen Tumoren der Knochen. Deutsche Zeitschr. Chir., Bd. 189, S. 113, 1924.
- 123) —, Zur Pathogenese der Ostitis fibrosa v. RECKLINGHAUSEN. Verhandl. d. deutsch. path. Ges., Bd. 21, S. 91, 1926.
- 124) —, Über Ostitis deformans und mit ihr angeblich und wirklich verwandte Knochenkrankungen. Schweiz. med. Wochenschr., Bd. 61, S. 598, 1926.
- 125) LOTSCH, F., Über generalisierte Ostitis fibrosa mit Tumoren und Cysten. Arch. f. klin. Chir., Bd. 107, S. 1, 1916.
- 126) LUBARSCH, O., Beiträge zur pathologischen Anatomie und Pathogenese der Unterernährungs- und Erschöpfungskrankheiten. Ziegler's Beitr., Bd. 69, S. 242, 1909.
- 127) —, Diskussionsbemerkung zu KONJETZNY: „Die sog. lokalisierte Ostitis fibrosa“. Arch. f. klin. Chir., Bd. 121, S. 147, 1922.
- 128) —, Diskussionsbemerkung zu den Vorträgen über Osteodystrophia fibrosa. Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 21, S. 134, 1926.
- 129) —, „Entzündung“; in ASCHOFF, Pathologische Anatomie. Jena, Fischer, Bd. 1, S. 540, 1928.
- 130) LÜTZENBERGER, H., Über Ostitis fibrosa generalisata unter besonderer Berücksichtigung der Ätiologie. Diss. Halle, 1926.
- 131) LUKOMSKY, J. H., Die Epuliden. Deutsche Monatsschr. f. Zahnheilk., Bd. 1, S. 697, 1926.
- 132) MANDL, F., Therapeutischer Versuch bei einem Falle von Ostitis fibrosa generalisata mittels Exstirpation eines Epithelkörperchentumors. Zentrabl. f. Chir., Bd. 1, S. 260, 1926.
- 133) —, Klinisches und Experimentelles zur Frage der lokalisierten und generalisierten Ostitis fibrosa. Arch. f. klin. Chir., Bd. 143, S. 1, 1926.
- 134) MAREK, J., Wesen, gegenseitige Beziehung und Therapie der Rachitis, der Osteomalacie und der Osteoporosen. Arch. f. wissenschaft. u. praktische Tierheilk., Bd. 1, S. 1, 1924.
- 135) MARFAN, Maladies des os. Paris, Baillière et fils, 1912.



- MARTENS, Osteodystrophia fibrosa (sog. Ostitis fibrosa) und maligne Neubildung. Med. Klin., Bd. 22, S. 391, 1926.
- MARX, H., Ostitis fibrosa circumscripta des Gesichtsschädels. Arch. f. Ohren-, Nasen- u. Kehlkopfheilk., Bd. 111, S. 146, 1924.
- MASSART, DUCROQUET, CHAUVEAU, De l'ostéite fibro-géodique, type RECKLINGHAUSEN. Bull. Soc. de pédiat. de Paris, Bd. 23, S. 256, 1925.
- MAXIMOW, A. A., The lymphocytes and plasma cells; in Cowdry, Special cytology. New York, Hoeber, Bd. 1, S. 321, 1928.
- , The macrophages or histiocytes; in Cowdry, Special cytology. New York, Hoeber, Bd. 1, S. 427, 1928.
- MAXWELL, J. P. and MILES, L. M., Osteomalacia in China. J. Obst. a. Gynaec. Brit. Emp., Bd. 32, S. 1, 1925.
- MAYER, M., Exotische Krankheiten. Berlin, Springer, 1924.
- MAYER, O., The pathology of otosclerosis. J. Laryngol. Rhinol. a. Otol., Bd. 43, S. 843, 1928.
- MCCOLLUM, E. V., Lit. siehe bei STEPP und GYÖRGY. S. 170 u. 284.
- MELLANBY, E., Experimental rickets. Medical research council. Spec. Rep. Series Nr. 61. London, 1921.
- MEYER, O., Zur Kenntnis der generalisierten Ostitis fibrosa und der Epithelkörperchenveränderungen bei dieser Erkrankung. Frankfurter Zeitschr. f. Path., Bd. 20, S. 115, 1917.
- MEYER, W., Über die Epulis bei unseren Haustieren. Diss. Leipzig, 1910.
- V. MICULICZ, J., Über cystische Degeneration der Knochen. Verhandl. d. Ges. deutscher Naturforscher u. Ärzte, Bd. 76, S. 107, 1904.
- MÖNCKEBERG, J. G., Über Cystenbildung bei Ostitis fibrosa. Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 7, 232, 1904.
- , Zur Frage der sog. Riesenzellensarkome der Knochen. Virchow's Arch., Bd. 246, S. 116, 1923.
- MOLINEUS, Über die multiplen braunen Tumoren bei Osteomalacie. Arch. f. klin. Chir., Bd. 101, S. 333, 1913.
- MÜLLER, G. u. GLASS, A., Diseases of the dog and their treatment. Chicago, Eger, 1926.
- NAGER, F. R., Über die Mitbeteiligung des Felsenbeines bei der Ostitis deformans (PAGET). Zeitschr. f. Ohrenheilk., Bd. 77, S. 195, 1919—1920.
- NÉLATON, E., Mémoire sur une nouvelle espèce de tumeurs bénignes des os ou tumeurs à myeloplaxes. Thèse de Paris 1860, zit. nach v. RECKLINGHAUSEN.
- OEHME, C., Über die Beziehungen des Knochenmarks zum neugebildeten, kalklosen Gewebe bei Rachitis. Ziegler's Beitr., Bd. 44, S. 197, 1908.
- PAEHR, K., Beiträge zur Kasuistik der Geschwülste des Unterkiefers der Pferde. Monatsh. f. prakt. Tierheilk., Bd. 24, S. 511, 1913.
- PAGET, J., On a form of chronic inflammation of bones (Osteitis deformans). Tr. Roy. Med.-Chir. Soc., London, Bd. 60, S. 37, 1877.
- , Additional cases of osteitis deformans. Tr. Roy. Med.-Chir. Soc., London, Bd. 65, S. 265, 1882.
- PARK, E. A., The etiology of rickets. Physiol. Rev., Bd. 3, S. 106, 1923.
- PHILIPS, H. B., PAGET's disease. J. Bone a. Joint Surg., Bd. 8, S. 643, 1926.
- PICK, L., Über marantische Knochenatrophie beim Menschen und Kalkmetastase. Berliner klin. Wochenschr., Bd. 48, S. 637, 1911.
- , Über die senile Atrophie am Hundeschädel. Berliner klin. Wochenschr., Bd. 48, S. 797, 1911.
- , Die indikatorische Bedeutung der Kalkmetastase für den Knochenabbau. Berliner klin. Wochenschr., Bd. 54, S. 797, 1917.
- , Zur Klinik und Systematik der sog. Ostitis fibrosa. Zentralbl. f. Chir., Bd. 3, S. 145, 1926.
- , Diskussionsbemerkung zu MARTENS. Med. Klin., Bd. 22, S. 391, 1926.
- , Bösartige Geschwulstbildung (metastasierendes Chondrosarkom) bei Ostitis fibrosa. Berliner Ges. f. Path., Bd. 25, S. 2, 1926.
- POMMER, G., Untersuchungen über Osteomalacie und Rachitis. Leipzig 1885.
- , Bemerkungen zu den Lehren vom Knochenschwunde. Arch. f. mikr. Anat., Bd. 102, S. 324, 1924.
- , Über Osteoporose, ihren Ursprung und ihre differential-diagnostische Bedeutung. Arch. f. klin. Chir., Bd. 136, S. 1, 1925.
- RABL, C. R. H., Experimentelle Untersuchungen über Osteoporose und Rachitis. Arch. f. klin. Chir., Bd. 137, S. 619, 1925.



- 171) RABL, C. R. H., Über den Einfluß sauren und alkalischen Futters auf Mäuse, besonders auf die Entstehung hyaliner (amyloider?) und wachziger Degeneration. *Virchow's Arch.*, Bd. 266, S. 133, 1927.
- 172) v. RECKLINGHAUSEN, FR., Die fibröse oder deformierende Ostitis, die Osteomalacie und die osteoplastische Karzinose in ihren gegenseitigen Beziehungen. Separat abdr. a. d. *Rud. Virchow z.* 13. Okt. 1891 gewidm. Festschr. d. Assistenten.
- 173) —, Eine diffuse, chronische, schalenbildende, ossifizierende Periostitis. *Zentralbl. f. allg. Path. u. path. Anat.*, Bd. 7, S. 862, 1896 und dasselbe in: *Wiener klin. Wochenschr.*, Bd. 9, S. 673, 1896.
- 174) —, Untersuchungen über Rachitis und Osteomalacie. Jena, Fischer, 1910.
- 175) REHN, E., Die Schnüffelkrankheit des Schweines und ihre Beziehungen zur Ostitis fibrosa infantilis des Menschen. *Ziegler's Beitr.*, Bd. 44, S. 274, 1908.
- 176) REIMANN, P., Über die benigne Epulis und die epulisähnlichen malignen Sarkome des Alveolarfortsatzes der Kiefer. *Schweiz. Monatsschr. f. Zahnheilk.*, Bd. 5, S. 129, 1925.
- 177) REINHARDT, H., Beitrag zur Pathologie des Hamsters. *Virchow's Arch.*, Bd. 212, S. 1, 1922.
- 178) RIBBERT, H., Zur Kenntnis des Riesenzellensarkoms. *Frankfurter Zeitschr. f. Path. u. Anat.*, Bd. 20, S. 29, 1917.
- 179) RIEVEL, H., Knochenpathologie der Tiere; in LUBARSCH-OSTERTAG, *Ergeb. d. anat. Path. u. path. Anat.*, Bd. 2, S. 622, 1907.
- 180) RITTER, C., Die Epulis und ihre Riesenzellen. *Deutsche Zeitschr. f. Chir.*, Bd. 1, S. 1, 1900.
- 181) —, Über Epithelkörperchenbefunde bei Rachitis und anderen Knochenkrankungen. *Frankfurter Zeitschr. f. Path.*, Bd. 24, S. 137, 1920.
- 182) ROBERTS, R. E. and COHEN, M. J., Osteitis deformans (PAGET's disease of bone). *Proc. Roy. Med. Soc. Sect. Electr. London*, Bd. 19, S. 13, 1926.
- 183) RÖMER, O., „Die Epulis“; in HENKE-LUBARSCH, *Handb. d. spez. path. Anat. u. Hist.*, Bd. IV, 2, S. 432, 1928.
- 184) RÖSSLE, R., „Allgemeine Pathologie der Zelle und der Gewebe“; in ASCHOFF, *Pathologische Anatomie*, Jena, Fischer, Bd. I, S. 307, 1928.
- 185) ROHDE, C., Beiträge zur Frage der Metaplasie des Bindegewebes in Knochen. *Arch. f. klin. Chir.*, Bd. 128, S. 302, 1924 u. Bd. 129, S. 435, 1924.
- 186) —, Does bone form from osteoblasts or from a metaplasia of the surrounding connective tissue? *Surg. Gynec. Obst.*, Bd. 41, S. 740, 1925.
- 187) ROSEN, A., Das Blutbild bei Ostitis fibrosa. *Mitt. a. d. Grenzgeb. d. Med. u. Chir.*, Bd. 35, S. 586, 1922.
- 188) ROSENSTIRN, J., A contribution to the study of myositis ossificans progressiva. *Ann. Surg.*, Bd. 68, S. 485, 1918.
- 189) ROSSKOPF, Multiple Kiefercysten bei einem Hunde. *Diss.* Gießen, 1910.
- 190) SCHMEY, M., Über die Veränderungen am Skelettsystem, insbesondere am Kiefer bei senilen Hunden. *Virchow's Arch.*, Bd. 220, S. 52, 1915.
- 191) SCHMIDT, M. B., Referat über Rachitis und Osteomalacie. *Verhandl. d. deutschen path. Ges.*, Bd. 13, S. 3, 1919.
- 192) —, „Der Bewegungsapparat“; in ASCHOFF, *Pathologische Anatomie*. Jena, Fischer, Bd. II, S. 184, 1928.
- 193) SCHMORL, G., Zur pathologischen Anatomie der MÖLLER-BARLOW'schen Krankheit. *Ziegler's Beitr.*, Bd. 30, S. 215, 1901.
- 194) —, Die pathologische Anatomie der rachitischen Knochenkrankung mit besonderer Berücksichtigung ihrer Histologie und Pathogenese. *Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk.*, Bd. 4, S. 403, 1909.
- 195) —, Über die Beziehungen der Knorpelmarkkanäle zu der bei Rachitis sich findenden Störung der endochondralen Ossifikation. *Verhandl. d. deutschen path. Ges.*, Bd. 13, S. 40, 1909.
- 196) —, Die pathologische Anatomie der Rachitis. *Münchener med. Wochenschr.*, Bd. 3, S. 1256, 1909.
- 197) —, Demonstrationen. *Verhandl. d. deutschen path. Ges.*, Bd. 16, S. 352, 1913.
- 198) —, Über die Beziehungen der Ostitis fibrosa zur Osteomalacie und Rachitis. *Klin. Wochenschr.*, Bd. 12, S. 496, 1926.
- 199) —, Zur Kenntnis der Ostitis fibrosa. *Verhandl. d. deutschen path. Ges.*, Bd. 1, S. 71, 1926.
- 200) SCHOEN, R., Ostitis deformans (PAGET) mit Diabetes insipidus, nervösen und endokrinen Störungen. *Münchener med. Wochenschr.*, Bd. 71, S. 1713, 1924.
- 201) SCHÜTZ, W., Rachitis der Hunde. *Virchow's Arch.*, Bd. 46, S. 350, 1869.
- 202) SCUDDER, CH. L., Tumors of the jaws. Philadelphia, Saunders, 1912.

- 3) v. SEEMEN, H., Über die primäre heterotopie Knochenbildung. Münchener med. Wochenschr., Bd. 32, S. 1401, 1928.
- 4) SHOHL, A. T. and BENNET, H. B., Rickets in dogs; metabolism of calcium and phosphorus. J. Biol. Chem., Bd. 76, S. 633, 1928.
- 5) SIEGMUND, H., Bemerkungen über die Entwicklung ostoklastischer Resorptionsgewebe und die Riesenzellenepulis. Verhandl. d. deutschen path. Ges., Bd. 21, S. 86, 1926.
- 6) —, Bemerkungen über den Bau und das Wesen der Riesenzellenepulis. Deutsche Monatsschr. f. Zahnheilk., Bd. 44, S. 270, 1926.
- 7) SIEGMUND, H. u. WEBER, R., Pathologische Histologie der Mundhöhle. Leipzig, Hirzel, 1926.
- 8) SISK, J. N., Osteitis fibrosa cystica. Surg. Gynec. Obst., Bd. 41, S. 481, 1925.
- 9) SKUBISZEWSKI, L., Wachstum transplantierten embryonalen Gewebes und Geschwulstgenese. Zeitschr. f. Krebsforsch., Bd. 26, S. 308, 1928.
- 0) SOROUR, M. F., Versuche über Einfluß von Nahrung, Licht und Bewegung auf Knochenentwicklung und endokrine Drüsen junger Ratten mit besonderer Berücksichtigung der Rachitis. Ziegler's Beitr., Bd. 71, S. 467, 1923.
- 1) SPRING, K., Ostitis fibrosa der Kiefer und ihr Einfluß auf die Dentition. Arch. f. klin. Chir., Bd. 149, S. 385, 1928.
- 2) STENHOLM, T., Pathologisch-anatomische Studien über die Osteodystrophia fibrosa. Akadem. Abhandl., Uppsala, Almqvist und Wiksells, 1924.
- 3) STILLING, H., Über Osteitis deformans. Virchow's Arch., Bd. 119, S. 542, 1890.
- 4) STUMPF, R., Über die isoliert auftretende cystische und cystisch-fibröse Umwandlung einzelner Knochenabschnitte. Deutsche Zeitschr. f. Chir., Bd. 114, S. 417, 1912.
- 5) SUTHERLAND, C. G., The differentiation of osteitis deformans and osteoplastic metastatic carcinoma. Radiology, Bd. 10, S. 150, 1928.
- 6) TODYO, R., Über das Verhalten der Epithelkörperchen bei Osteomalacie und Osteoporose. Frankfurter Zeitschr. f. Path., Bd. 10, S. 219, 1912.
- 7) VIRCHOW, R., Die krankhaften Geschwülste. Berlin, Hirschwald, 1864—1865.
- 8) WARSCH, N. u. OBERHAMMER, K., Zur Kenntnis der Entstehungsbedingungen der sog. Ostitis fibrosa. Arch. f. Orthop., Bd. 24, S. 521, 1927.
- 9) WATSON, WM. T., A case of osteitis deformans. Bull. Johns Hopkins Hosp., Bd. 9, S. 133, 1898.
- 0) WEBER, M., Schliffe von macerierten Röhrenknochen und ihre Bedeutung für die Unterscheidung der Syphilis und Osteomyelitis von der Osteodystrophia fibrosa sowie für die Untersuchung fraglich syphilitischer, prähistorischer Knochen. Ziegler's Beitr., Bd. 78, S. 441, 1927.
- 1) —, Bone pathology and its relation to the problem of otosclerosis. Annal. Otol. Rhin. a. Laryng., Bd. 37, S. 1232, 1928.
- 2) WEGELIN, C., „Schilddrüse“; in HENKE-LUBARSCH, Handb. d. spez. path. Anat. u. Histol., Bd. 8, S. 1, 1926.
- 3) WEIDENREICH, F., Knochenstudien I und II. Zeitschr. f. d. ges. Anat., Bd. 69, S. 382 u. 558, 1923.
- 4) WILHELM, S. F., Osteitis fibrosa and the hyperostotic form of bone syphilis. Surg. Gynec. Obst., Bd. 41, S. 624, 1925.
- 5) WILLIES, O., Über Rachitis der Kieferknochen. Arch. f. wissenschaft. u. prakt. Tierheilk., Bd. 34, S. 623, 1908.
- 6) WÜLFING, M., Zur Kritik der Knochentumoren unbestimmten Charakters (Pseudotumoren). Deutsche Zeitschr. f. Chir., Bd. 191, S. 397, 1925.
- 7) ZIEMANN, H., Über die Ngundu-Krankheit bei Affen und Menschen. Arch. f. Schiffs- u. Tropenhyg., Bd. 26, S. 331, 1922.
- 8) ZOBEL, Rachitisches Siechtum bei einer Ziege. Berliner tierärztl. Wochenschr., Bd. 19, S. 553, 1903.

Lippert & Co. G. m. b. H., Naumburg a. S.

eben erschienen:

# Leitfaden zur Untersuchung auf die parasitischen Protozoen des menschlichen Magen-Darmkanals

Von

Dr. med. F. W. Bach

ao. Prof. für Hygiene u. Bakteriologie a. d. Universität Bonn,  
Direktor des Preuß. Medizinaluntersuchungsamtes Stade

Mit 51 Abbildungen im Text

IX, 140 S. gr. 8<sup>o</sup> 1929 Rmk 7.—, geb. 8.50

Inhalt: I. Die parasitischen Darmprotozoen des Menschen, einschließlich wichtiger Kotbewohner. 1. Rhizopoden. 2. Flagellaten. 3. Sporozoa. II. Untersuchungstechnik. 1. Grundsätzliches über Untersuchungen Darmprotozoen. 2. Das Untersuchungsmaterial und seine Beschaffung. 3. Äußere Untersuchung des Untersuchungsmaterials. 4. Verarbeitung des Untersuchungsmaterials. Mikroskopische Untersuchung. — Literaturverzeichnis.

Die Beschäftigung mit den parasitischen Protozoen des menschlichen Darmkanals ist durchaus nicht nur in tropischen und subtropischen Gebieten Bedeutung, sie hat — wegen einer unberechtigten, in ärztlichen Kreisen aber weit verbreiteten Ansicht — auch unseren Breiten praktischen und theoretischen Wert. Eine einseitig bakteriologische Stellung läßt bei uns manche parasitologisch wertvolle Beobachtung auf dem Gebiete der Protozoenkunde verloren gehen und manche wichtige Feststellung zum Nutzen eines Kranken.

Der 1. Teil des Leitfadens bringt kurze Beschreibungen der verschiedenen als Parasiten des menschlichen Darmkanales in Betracht kommenden Protozoenarten, begleitet durch differential-diagnostisch gelegentlich wichtige nicht-parasitische zoische Formen. Der 2. Teil behandelt die Untersuchungsmethoden, vor allem vom Gesichtspunkte der Praxis. Die Abbildungen bringen nur eine Auswahl der charakteristischeren Erscheinungsformen; sie sind fast durchweg in gleicher Vergrößerung wiedergegeben, da häufiger Wechsel der Vergrößerung erfahrungsgemäß das Vorstellungsvermögen vermindert und den Vergleich erschwert, und sind außerdem in einer — mit Absicht mäßigen — Vergrößerung gehalten (1250—1300fach), die der bei üblicher mikroskopischer Untersuchung entspricht. Nur wo die Veranschaulichung erst bei stärkerer Vergrößerung einer klareren Organisationseinzelheiten wichtig erschien, ist die Wiedergabe in stärkerer Vergrößerung erfolgt.



# Der Einfluß eisenarmer und eisenreicher Nahrung auf Blut und Körper

Von

Prof. Dr. M. B. Schmidt  
Würzburg

Mit 16 Abbildungen im Text und 1 Tafel

VII, 89 S. gr. 8° 1928 Rmk 6.—

Inhalt: Grundzüge und Probleme des Eisenstoffwechsels. / Fütterungsversuche an Mäusen. / Blutzustand und Eisengehalt der Organe bei Eisenmangel und nachfolgende Eisenfütterung. / Gaswechselversuche. / Die Wachstumshemmung durch Eisenmangel und ihre Beseitigung durch Eisenfütterung. / Die anatomischen Verhältnisse der Wachstumshemmung. / Die Thymusdrüse und die übrigen innersekretorischen Organe. / Die Gewebsatmung bei eisenarmen und eisenreichen Tieren. / Die Herzhypertrophie der eisenarmen Tiere. / Die Myokardverkalkung der anämischen Tiere. / Die Lipämie und Organverfettung der anämischen Tiere. / Die Wirkung anderer Metalle auf eisenarme Tiere. / Das Wesen der Eisenwirkung. / Eine Apparatur zur Bestimmung des Gasstoffwechsels bei der Maus. Von Dr. H. Kunstmann. / Literatur.

Die Schrift beschäftigt sich mit der Rolle der Milz und Leber bei der Verarbeitung des Eisens und der Bedeutung desselben für die Blutbildung und die Entwicklung des Körpers und seiner Organe auf Grund von Versuchen an weißen Mäusen. Ueber die Anfänge derselben hat Verf. in drei Vorträgen 1912—1914 berichtet. Der letzte dieser Vorträge befaßte sich speziell mit der Tatsache, daß nach der Exstirpation der Milz die Kupfferschen Sternzellen der Leber in Wucherung geraten und die verloren gegangene Funktion der Milzpulpazelle beim Erythrozytenabbau zum Teil übernehmen. Auf dieser Seite der Frage geht die vorliegende Schrift nicht von neuem ein.

In der Fortsetzung der eisenarmen Ernährung durch mehrere Generationen war ein Weg gefunden worden, um eine Eisenverarmung des Körpers hervorzurufen. Die Darstellung zeigt, daß im Extrauterinleben ein bestimmter Komplex von Erscheinungen entsteht, nämlich mangelhafte Blutbildung, mangelhaftes Körperwachstum und mangelhafte Organentwicklung, wenn die Versorgung des Körpers mit Eisen schon von der Fötalzeit an stark eingeschränkt wird. Die allgemeinen Gesetze über die Bedeutung des Eisens für das Blut und die Gewebe, welche sich aus den Untersuchungen ergeben haben, lassen wohl eine Anwendung auch auf den Menschen zu.

Münch. med. Wochenschr. 1929, Nr. 13: Eine wirklich klassisch Arbeit, die Frucht fast 20jähriger Beschäftigung mit den Problemen des Eisenstoffwechsels liegt hier vor. Die Untersuchungen gründen sich auf den geglückten Versuchen, die normalen Eisendepots des Körpers, vornehmlich die Hauptdepots in Milz und Leber vollständig zu leeren und so beim Versuchstier einen Grundzustand zu schaffen, der Vergleiche mit den schweren menschlichen Anämien gestattet und gleichzeitig auch den Einfluß eisenhaltiger Nahrung auf die Anämien erkennen läßt. . . . Die Arbeit Schmidts wird grundlegend werden für alle Arbeiten, die sich mit der Therapie der menschlichen Anämien beschäftigen und wird zu weiteren wichtigen Ergebnissen bei Vergleichung der experimentellen Anämien mit der des Menschen führen. Oberndorfer, München.

Klinische Wochenschrift 1928, Nr. 44: . . . Wir wissen über den Eisenstoffwechsel so wenig, daß jeder Fortschritt dankbar begrüßt werden muß. Daß M. B. Schmidt gelungen ist, tiefer einzudringen als frühere Untersucher, liegt in der von ihm geschaffenen neuen Methodik. . . . Schmidt hat hier nicht nur eine neue Methodik geschaffen, deren sich auch die klinische Eisenforschung mit Erfolg bedienen können; er hat auch wichtige neue Zusammenhänge (Thymus-Herz) erkannt und, was uns Kliniker besonders interessiert, die Reversibilität einer Art der Herzhypertrophie bewiesen.

Morawitz, Leipzig.

## A CLINICAL STUDY OF TUBERCULIN FRACTIONS PREPARED FROM NONPROTEIN CULTURE MEDIA<sup>1</sup>

FREDERICK EBERSON<sup>2</sup> AND ERNEST WOLFF<sup>3</sup>

In previous experimental and clinical studies (1) published during 1925-1927, one of us (F. E.) has stressed the inadequacy of the Old Tuberculin test material and questioned its diagnostic value. Moreover, it is felt that, despite the frequent contributions to the subject of tuberculins and their diagnostic properties, a certain type of detailed analysis of groups of patients has not been reported in the literature.

An exhaustive clinical and statistical analysis of the observed facts is therefore presented in this report. In this comparative study of skin reactions made with Old Tuberculin and with a fraction of tuberculin prepared from a synthetic nonprotein culture medium in which tubercle bacilli had been cultivated, are embodied the results of an investigation that is now in its fifth year. The apparent advantage of this modified tuberculin for diagnostic purposes is its freedom from nonspecific irritating components and from protein materials that are unrelated to the tubercle bacillus itself.

As might be expected, certain tuberculin components have their homologues in the fractions isolated from tubercle bacilli by chemical methods similar to or identical with those used for tuberculin studies.

Recently, the coöperative investigations conducted by the National Tuberculosis Association have confirmed and extended much of the earlier work published on the chemical analysis of tubercle bacilli and tuberculins. Notably Johnson (2), Anderson (3), Long and his associates (4), Petroff (5), and others have made valuable contributions in this field. Prior to these investigators Goris (6) in 1920 had already

<sup>1</sup> This investigation was aided, in part, by a grant from the San Francisco Tuberculosis Association and the California State Tuberculosis Association. Read in abstract before the Pathology and Bacteriology Section of the California State Medical Association, at its 57th annual session held at Sacramento, California, May 2, 1928.

<sup>2</sup> Department of Medicine, University of California Medical School, San Francisco, California.

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, University of California Medical School, and the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, San Francisco, California.

shown by extensive chemical studies of tubercle bacilli that a phosphatide could be isolated having specific properties. This substance is identical with that described by Anderson recently. It has been isolated also from tuberculin prepared from nonprotein culture media and possesses specific diagnostic properties (7). Goris has also referred to alcohol-insoluble substances derived from tubercle bacilli. These have been found in tuberculin and reported during the past few years (4) (7). The relation of acid-fastness to certain lipoidal constituents, shown by Goris, was confirmed three years later by Long (8).

Other studies related to analysis of the tubercle bacillus and tuberculin have been published by Nègre (9), Boquet (10), and Massias (11), antedating confirmatory work by Pinner (12), Long (4), Anderson (3), Zinsser (13), Mueller (14), and others. Especially interesting was Boquet's findings of a specific lipoidal element in tubercle bacilli. This confirmed the observations of Goris and later was again substantiated by Long.

Application of the principles of bacteriological and chemical analysis to large-scale production of tuberculin has been suggested naturally as the outcome of the numerous contributions that have been cited, and has been emphasized especially by Johnson (2).

It is believed that comparative studies similar to those we have been advocating and have reported here may aid in correlating laboratory and clinical data on tuberculins or similar products to be used for diagnosis or therapy.

#### PREPARATION OF TUBERCULIN FRACTIONS<sup>4</sup>

A moderately virulent strain of human tubercle bacilli was grown in a substrate containing ammonium succinate, dipotassium phosphate, magnesium sulphate, calcium chloride and distilled water, with a pH value of 7.0. The media, originally described by Gessard and Vaudremer (15), were tested in different H-ion concentrations and modified by one of us (*loc. cit.*). After six weeks' incubation at 38.0°C., 1500 cc. of the material were evaporated to one-tenth volume and the fractions secured from it. A weighed volume was added to 19 volumes of pure methyl alcohol to effect complete precipitation, and filtered. To the filtrate, containing washings of methyl alcohol derived from the alcohol-insoluble fraction, were added four volumes of pure ethyl ether, and a second frac-

<sup>4</sup> For the preparation of generous supplies of these materials and coöperation, acknowledgment is made to Eli Lilly & Co., (Biological Department), Indianapolis, Indiana.



tion separated by filtration. The precipitate was washed thoroughly with ether and the combined filtrates evaporated virtually to dryness to yield the third fraction.

The alcohol-insoluble fraction (T.E.) represented 5.17 gm. of precipitate and was taken up in 45 cc. of salt solution, each cubic centimetre containing 114.9 mgm. of material. The ether-insoluble portion represented 2.4 gm. of precipitate in a volume of 45 cc. of salt solution, making 53.3 mgm. per cc. The ether-soluble fraction represented 1.295 mgm. of precipitate in 15 cc. of salt solution, or 86.3 mgm. per cc. All the materials were preserved with 0.25 per cent ether-tricresol.

The alcohol-insoluble fraction represented 3.44 per cent by weight of the original tuberculin, the ether-insoluble fraction 1.6 per cent, and the ether-soluble 0.86 per cent. For clinical tests the fractions were diluted so that 1 cc. contained 1.0 mgm. of tuberculin material.

In the present investigation only the results obtained with T.E. will be reported. The ether-insoluble fraction, a phosphatide derivative, also gave specific skin reactions. A preliminary statement of the chemical analysis and results obtained with this phosphatide (16) was published in 1925, and clinical tests were described in subsequent reports (*loc. cit.*).

Numerous substrates for the preparation of tuberculin have been described in the literature. With minor modifications these materials have differed chiefly in the names of the writers associated with the adaptations. Among these Kühne (17) in 1894, Ruppel and Rickmann (18) in 1910, Löwenstein and Pick (19) in 1911, Gessard and Vaudremer (15) in 1922, and Long (20) in 1924, have published reports on "synthetic media" for tubercle bacilli. Excepting that of Gessard and Vaudremer, all the other substrates contained asparagin as a base, with slight modification in the content of citric, ammonium, phosphoric, potassium or sodium salts. The medium described by Gessard and Vaudremer should appeal to one because of its simplicity and ease and cheapness of preparation, containing but four ingredients as compared with the seven and eight of other writers. One of us (F.E.) has confirmed the observation that glycerine is not indispensable for growth with the simplest of media, although 1 to 2 per cent by volume favors growth of the tubercle bacillus and ensures acid-fastness which may be lost almost completely after one transplant when glycerine is not present.



## CLASSIFICATION OF CLINICAL MATERIAL

In studying the efficacy of test materials, it is not sufficient to compare the skin reactions without reference to some basic standard. It would seem more important to analyze the observed discrepancies in terms of a carefully evaluated group of clinical symptoms, signs, and auxiliary laboratory data, and to refer the observations to the patient, who must always be considered as the standard.

The diagnosis of juvenile tuberculosis presents many difficulties of which the greatest, perhaps, lie in that large borderline group of patients having symptoms and signs generally rendering a patient a tuberculosis suspect. There is doubt, however, whether the so called symptom-complex of tuberculosis in childhood is by any means a fixed quantity, and whether, as such, it can be used as a basis for certain diagnosis. An attempt was made, therefore, in our study to subject all the available data to an exhaustive analysis with the aim of correlating, wherever possible, the numerous variables most likely to confuse the picture. By this method we were able to compare the different skin reactions in terms of definite variables that occurred in the fixed groups chosen for study.

Our classification, as a point of departure, was based upon the complete clinical examination, history and X-ray findings, with the results of Old Tuberculin tests as a tentative gauge for comparison with the tuberculin fractions.

*Symptoms:* The items considered were loss of weight, or failure to gain, lack of appetite, fatigability, cough, night-sweats, lassitude, nervousness and elevation of temperature.

*Clinical Findings:* The points considered were malnutrition, tuberculous lymphadenitis, involvement of the bones and cervical lymph nodes, phlyctenular processes and percutory and auscultatory findings.

## DIAGNOSIS AND CLINICAL IMPRESSION

The tuberculous group comprised pulmonary tuberculosis, tuberculosis of the bronchial lymph nodes, tuberculous cervical adenitis, healed primary focus, tuberculosis of bones and peribronchial tuberculosis. The nontuberculous group included enlarged bronchial lymph nodes, nontuberculous pulmonary disease, clinically normal patients, the three named having positive tuberculin tests (O.T.), and a group with negative tuberculin tests and likewise free from tuberculous manifestations.

In all the groups attention was paid to associated diagnoses in every

case, so that the possible effect of complicating clinical conditions upon tuberculin reactions might be properly interpreted.

*Roentgenographic Findings:* Chest films were diagnosed under the headings of primary focus, calcified bronchial lymph nodes, hilum calcification, peribronchial infiltration, enlarged bronchial lymph nodes, increased bronchial markings, parenchymal tuberculosis, thickened interlobar pleura, thickened apical pleura, and negative.

*Contact and Noncontact History:* The history of definite exposure to and contact with tuberculosis was ascertained as accurately as possible. It is evident that the greatest source of error is found in the so called noncontact case, owing to our inability to confirm this point in children beyond the nursery age. For practical purposes, however, this division into two groups may be of interest if it be not of definitely proved value.

#### INTRACUTANEOUS TUBERCULIN TESTS

Comparative tests were made with human Old Tuberculin and tuberculin fraction (T.E.), using a fixed dilution equivalent to 0.1 mgm. of tuberculin substance. Suitable controls were made with salt solution and culture media from which the tuberculins had been prepared. The simultaneous injections were observed at 24-, 48- and 72-hour intervals, and in most cases until the visible skin reaction had disappeared. The areas were measured and the degree of infiltration and reddening noted. For roughly quantitative purposes, the reactions were classified as follows:

*A:* Doubtful test, with area less than 0.5 by 0.5 cm., without reddening or infiltration, and fading within 24 hrs.

*B:* Slightly positive test, with area 0.5 by 0.5 to 1.0 by 1.0 cm., without definite reddening or infiltration or with slight reddening only, and persisting 24 hours.

*C:* Moderately positive test, with area 1.0 by 1.0 cm., with slight to moderate reddening and infiltration, and persisting 48 hours.

*D:* Strongly positive test, with area 2.0 by 2.0 cm. or more, with profound reddening and infiltration, and persisting more than 48 hours.

*Negative:* Areas too small and too transitory to be considered under the doubtful group A.

The skin reactions were classified further with reference to agreement or disagreement of the comparative tuberculin and fractional tests. Five subdivisions were made.

- 1: Old tuberculin negative, and fraction positive
- 2: Old tuberculin positive, and fraction negative
- 3: Old tuberculin same as fraction
- 4: Old tuberculin weaker than fraction
- 5: Old tuberculin stronger than fraction

In each of these groups, the preceding grades of reaction (*A, B, C, D, Neg.*) were noted, so that every possible relation of one test to the other might be visualized.

We were able in the majority of patients to study comparative reactions for two to three years and in a considerable number for four years.

### *1: Tuberculosis of Bronchial Lymph Nodes*

In this group of 27 contacts and 12 noncontacts was represented a healed condition, to which 31 cases definitely belonged, under the heading of healed bronchial lymph-node tuberculosis without any other manifestations.

The skin reactions with O.T. were greater than tuberculin fraction in 23, or 59 per cent, of all the cases, and of these there were 2 that showed a positive O.T. test when the test with the fraction was negative. Of these two patients, one was clinically normal and had enlarged bronchial lymph nodes with some calcification, and the other had enlarged lymph nodes that were not indubitably tuberculous.

In the group of 31 patients (healed and without any other manifestations) 18 reacted more strongly to O.T. than to tuberculin fraction, and of these tests 14 were strong, that is, *D* and *C*, of which 11 were *D*. Included in the series were 2 that reacted positively to O.T. when the test with tuberculin fraction was negative. Of the reactions with the fraction giving a stronger test than O.T. 3 were doubtful and 2 were weakly positive.

The results showed that 20 tests were definitely or strongly positive to O.T. when the fraction gave doubtfully positive, weak or negative reactions. When the tests with O.T. and fraction were the same, 4 of the 8 cases in this group gave strong reactions, 3 moderate and 1 slightly positive.

On the basis of the observations made in this group of patients it would appear that the O.T. gave less information as compared with the tuberculin fraction (T.E.).

*2: Enlarged Bronchial Lymph Nodes*

In this group were considered:

A: Enlarged bronchial lymph nodes with positive O.T.

B: Enlarged bronchial lymph nodes associated with healed bronchial lymph-node tuberculosis

TABLE 1  
*Tuberculosis of bronchial lymph nodes*

CONTACTS	NONCONTACTS	TOTAL	SKIN REACTIONS
14	7	21	O.T. greater than tuberculin fraction (>)
5	0	5	O.T. smaller than tuberculin fraction (<)
2	0	2	O.T. positive, tuberculin fraction negative (+)
6	5	11	O.T. equal to tuberculin fraction (=)
27	12	39	Total

*Comparative skin tests and degree of reaction*

SUBGROUP		>			<			+			=					Negative
			D	C	B	A	B	C	D	C	B	D	C	B	A	
A	Contact	1	1													2
	Noncontact	1											1			
B	Contact	0														1
	Noncontact	1	1													
C	Contact	1	1													2
	Noncontact	1										1				
D	Contact	2	1									1				2
	Noncontact	0														
E	Contact	0														1
	Noncontact	1	1													
F	Contact	23	8	1	2	3	2		1	1		3	1	1		31
	Noncontact	8	3	2								1	2			
Total.....		39	21			5			2			11				

A: Tuberculosis of bronchial lymph nodes (active) with pulmonary involvement.

B: Tuberculosis of bronchial lymph nodes associated with tuberculous cervical adenitis.

C: Tuberculosis of bronchial lymph nodes associated with tuberculosis of bones.

D: Tuberculosis of bronchial lymph nodes associated with primary focus.

E: Tuberculosis of bronchial lymph nodes associated with phlyctenular process.

F: Tuberculosis of bronchial lymph nodes (healed and without other manifestations).



C: Enlarged bronchial lymph nodes associated with tuberculous cervical adenitis

D: Enlarged bronchial lymph nodes associated with healed peribronchial tuberculosis

TABLE 2  
*Enlarged bronchial lymph nodes*

CONTACTS	NONCONTACTS	SKIN REACTIONS	TOTAL
13	7	O.T. greater than tuberculin fraction (>)	20
9	6	O.T. smaller than tuberculin fraction (<)	15
7	5	O.T. positive, tuberculin fraction negative (+)	12
14	11	O.T. equal to tuberculin fraction (=)	25
43	29	Total.....	72

*Comparative skin tests and degree of reaction*

SUBGROUP		>				<			+			=					
			D	C	B	A	B	C	D	C	B	D	C	B	A	Negative	
A	Contact	36	6	3	2	4	2	1	2		4	1	2	6	2	1	
	Noncontact	25	4	1	1	2	3			1	3	3	3	2	2		
B	Contact	2					1			1							
	Noncontact	1	1														
C	Contact	2	1	1													
	Noncontact	1				1				1		1					
D	Contact	1										1					
	Noncontact	2															
E	Contact	1										1					
	Noncontact																
F	Contact	1					1										
	Noncontact																
Total.....		72	20			15			12			25					

A: Enlarged bronchial lymph nodes with positive O.T. test.

B: Enlarged bronchial lymph nodes associated with healed tuberculosis of bronchial lymph nodes.

C: Enlarged bronchial lymph nodes associated with tuberculous cervical adenitis.

D: Enlarged bronchial lymph nodes associated with healed peribronchial tuberculosis.

E: Enlarged bronchial lymph nodes associated with phlyctenular processes.

F: Enlarged bronchial lymph nodes associated with tuberculosis of bones.

- E*: Enlarged bronchial lymph nodes associated with phlyctenular processes.  
*F*: Enlarged bronchial lymph nodes associated with tuberculosis of bones.  
*G*: Enlarged bronchial lymph nodes associated with small calcifications.

In this group 61 of the 72 cases were negative for clinical signs of tuberculosis and, of these, 9 gave complaints such as lassitude, fatigue, and the like. The skin reactions in this group, as shown in table 1, included 17 cases with O. T. greater than fraction, and 10 cases with O.T. positive when the fraction was negative, a total of 27 cases, or 44.2 per cent, with a predominating O.T. test. Of these 27 tests, 17 were moderately to very strongly positive (*C - D*).

TABLE 3  
*Nontuberculous pulmonary disease*

CONTACTS	NONCONTACTS	SKIN REACTIONS	>			<			+				=				Negative
			D	C	B	A	B	C	D	C	B	A	D	C	B	A	
3	4	(>) O.T. greater than tuberculin fraction	3	1	3												
0	2	(<) O.T. smaller than tuberculin fraction				1	1	0									
1	6	(+) O.T. positive, tuberculin fraction negative							2	1	4	0					
2	4	(=) O.T. equal to tuberculin fraction											1	2	1	2	0
6	16	Total.....	7			2			7				6				

In contrast, 5 tests with the fractional tuberculin were weakly positive (*B*) and 6 doubtful (*A*), and 6 moderately strong. The tests with fractional tuberculin were stronger than O.T. in 12 cases, of which 6 were doubtful, 5 weakly positive and 1 moderately positive. In cases with symptoms that might be construed as those of tuberculous activity it is noteworthy that the tuberculin fractions did not give negative tests when the O.T. tests were correspondingly positive. (Table 2.)

### 3: *Nontuberculous Pulmonary Disease*

This series included 22 patients classified as positive to O.T. and having nontuberculous pulmonary disease. There were 14 cases in which O.T. gave either a greater reaction than the fraction, or was positive when the fraction was negative. Sixteen cases out of twenty-two in the

entire group were noncontacts, among which were ten with O.T. predominating or positive when the fraction was negative. When O.T. was stronger, reactions with fractions were doubtful in 5 instances (*A*), slightly positive (*B*) in 2, and, by contrast, the O.T. reactions were marked (*D*) in 3 cases, definitely positive (*C*) in one, and slightly positive (*B*) in three.

In all the cases in which fractions gave reactions equal to O.T., showing medium or strong reactions, or in the cases in which fractions gave medium to strong tests and O.T. at the same time gave weak to doubtful results, symptoms and signs were present in the history that might have been attributable to tuberculous activity. This, we believe, would appear to be of some significance. (Table 3.)

#### *4: Clinically Normal Group*

This group was divided into (*A*) clinically normal, without pathological changes, but with a positive tuberculin test; (*B*) clinically normal, with small hilum calcifications and positive O.T.; and (*C*) clinically normal, with definite signs of healed tuberculous disease.

Ten out of 25 of this clinically normal *A* group gave greater reactions with O.T. than with fractions, and in 2 cases, in addition, positive tuberculin tests were obtained when fractions reacted negatively. It may be noted that in this group of 12, seven were contacts and 5 noncontacts. In the entire group of 25, fourteen were contacts and 11 noncontacts.

*Group B:* Five out of 11 gave a greater reaction with O.T. than with fractions and in addition 3 cases were positive when fractions were negative. In this group of 11, two cases were contacts and 9 noncontacts, and in the group of eight reactors, one was a contact and seven were noncontacts.

*Group C:* Four out of 7 in this group gave a greater reaction with O.T. than with fractions. In this group of 4, one was a noncontact and 3 were contacts.

The clinical group as a whole, numbering 43 cases, was divided almost equally between contact and noncontact patients, there being 22 of the former and 21 of the latter.

In all, 24, or 55.8 per cent, of the tests gave stronger reactions with O.T., and included 5 that were positive when the corresponding tests with the tuberculin fraction were negative. In 50 per cent of these the

reactions were classed as *D*. It is noteworthy that the more marked O.T. reactions occurred in those groups (*A* and *B*) in which either pathological changes or signs of healed tuberculous disease were not present. This was observed in 46.5 per cent of the total number of cases and in 83.3 per cent of the tests in which the O.T. reacted more strongly.

TABLE 4  
*Clinically normal*

CONTACTS			NONCONTACTS			SKIN REACTIONS	TOTAL
A*	B	C	A	B	C		
6	1	3	4	4	1	O.T. greater than tuberculin fraction (>)	19
2	0	1	2	1	2	O.T. smaller than tuberculin fraction (<)	8
1	1	0	1	2	0	O.T. positive, tuberculin fraction negative (+)	5
5	1	0	4	1	0	O.T. equal to tuberculin fraction (=)	11
14	3	4	11	8	3	Total.....	43

*Comparative skin tests and degree of reaction*

SUBGROUP*	>			<			+				-					TOTAL
	D	C	B	A	B	C	D	C	B	A	D	C	B	A	Negative	
A	5	2	3	1	1	2	0	0	1	1	3	1	5	0	0	25
B	3	2	0	0	1	0	2	1	0	0	1	0	1	0	0	11
C	2	1	1	1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	7
Total....	10	5	4	2	4	2	2	1	1	1	4	1	6	0	0	43

\*A: Clinically normal without pathological changes, but with a positive tuberculin test.

B: Clinically normal with small hilum calcification and positive tuberculin test.

C: Clinically normal with definite signs of healed tuberculous disease.

Inasmuch as this group comprises cases with tuberculous infection but without any active process, the marked O.T. reaction gives information that is not consistent with the clinical picture. We are more concerned in a group of this type with the relation that the test might bear to the significant clinical data. In this connection the lesser reactivity of the tuberculin fraction might appear to have more significance, particularly when negative results give more information. (Table 4.)



### 5: Negative Tuberculin Test

In this group of 17 cases with negative O.T. reactions, 10 were likewise negative with fractional tuberculin. Of the remaining 7, three gave a doubtful test, 2 a weakly positive and 2 (contacts) gave a strong reaction. In addition, these 2 patients showed a record of a positive O.T. test in the previous history. In all these cases symptoms and signs were present, suggesting a possible old infection. (Table 5.)

TABLE 5  
*Negative tuberculin test*

	O.T. NEGATIVE; TUBERCULIN FRACTION NEGATIVE	O.T. NEGATIVE; TUBERCULIN FRACTION POSITIVE				SIGNIFICANT FINDINGS
		A	B	C	D	
Contact	5	0	0	0	2	Cough, lassitude and thickened apical pleura
						Cough, night-sweats, lassitude, fatigue, loss of weight, loss of appetite, positive percussion and auscultation
Noncontact	5	3	2	0	0	Postpneumonia, bronchiectasis, loss of weight
						Night-sweats, cough, loss of weight
						Cough, loss of weight, night-sweats, fatigue, loss of appetite, positive percussion and auscultation
						Primary focus and peribronchial infiltration
						Lassitude, night-sweats, tubercle bacilli in sputum, cough

### 6: Pulmonary Tuberculosis and Peribronchial Tuberculosis

In these groups, numbering 20 patients, differentiating characteristics of the test substance suggested that the reaction with the tuberculin fraction was better correlated with the clinical findings. In a group of 5 patients, for example, the reaction with O.T. was smaller than with the tuberculin fraction. Among these were found 3 cases of pulmonary tuberculosis, one of which was associated with a pleuritic effusion, and 2 cases of peribronchial tuberculosis, associated in one instance with tuberculosis of the bones. However, since these groups were too small for detailed study and correlation it did not seem advisable to draw any rigid conclusions. In our opinion the value of a comparative study with

TABLE 6  
*Pulmonary tuberculosis and peribronchial tuberculosis*

DIAGNOSIS	ASSOCIATED DISEASE	CONTACT	NONCONTACT	SKIN TEST (LETTERS INDICATE DEGREE OF REACTION FOR SUBSTANCE USED IN TEST)
Pulmonary tuberculosis	Enlarged bronchial lymph nodes (healed)	+	-	O.T. smaller than tuberculin fraction (C D)
do	do	+	-	O.T. greater than tuberculin fraction (D B)
do	do	-	+	O.T. equal to tuberculin fraction (B)
do	do	-	+	O.T. greater than tuberculin fraction (D B)
do	do	+	-	O.T. greater than tuberculin fraction (D A)
do	do	-	+	O.T. greater than tuberculin fraction (D B)
do	do, and pleurisy with effusion	+	-	O.T. smaller than tuberculin fraction (C D)
do	do	+	-	O.T. positive, tuberculin fraction negative (D)
do	do	+	-	O.T. positive, tuberculin fraction negative (B)
do	do	+	-	O.T. equal to tuberculin fraction (D)
do	do	-	+	O.T. positive, tuberculin fraction negative (C)
do	do	+	-	O.T. smaller than tuberculin fraction (C D)
do	do	+	-	O.T. greater than tuberculin fraction (D C)
Peribronchial tuberculosis	Enlarged bronchial lymph nodes	+	-	O.T. greater than tuberculin fraction (C B)
do, inactive	Tuberculosis of bone (healed)	-	+	O.T. smaller than the tuberculin fraction (B C)
do, healed	Tuberculosis of bronchial lymph nodes	+	-	O.T. greater than tuberculin fraction (B A)
do, do	Enlarged bronchial lymph nodes	-	+	O.T. equal to tuberculin fraction (C)(1926)
do	do	-	+	O.T. smaller than tuberculin fraction (A B) (1927)
do	Questionable pulmonary tuberculosis	-	+	O.T. positive, tuberculin fraction negative (C)
do	do	+	-	O.T. equal to tuberculin fraction (D)
do	Phlyctenular process and enlarged bronchial lymph nodes	+	-	O.T. equal to tuberculin fraction (D)

*Résumé of skin reactions in 20 patients*

	PULMONARY TUBERCULOSIS	PERIBRONCHIAL TUBERCULOSIS
O.T. greater than tuberculin fraction.....	4	3
O.T. smaller than tuberculin fraction.....	3	2
O.T. equal to tuberculin fraction.....	2	2
O.T. positive, tuberculin fraction negative.....	3	1

the test substances under consideration can be better determined by devoting attention to the clinical groups of patients presenting vague or indefinite clinical conditions that might be mistaken for tuberculosis. (Table 6.)

*7: Tuberculous Cervical Adenitis*

In this group of 25 patients with definite evidence of tuberculous infection and healed tuberculous disease, including 8 tuberculous cervical adenitis, 6 tuberculosis of the bone and 11 healed primary foci, O.T. gave in all but 4 instances (84 per cent) medium or very marked reactions. The tuberculin fraction (T.E.) gave a medium or strong reaction in 11 cases, or 44 per cent.

TABLE 7

TUBER- CULOUS CERVICAL ADENITIS	TUBER- CULOSIS OF BONE	HEALED PRIMARY FOCUS	SKIN REACTIONS	TOTAL
6	3	5	O.T. greater than tuberculin fraction	14
0	2	2	O.T. smaller than tuberculin fraction	4
0	0	1	O.T. positive, tuberculin fraction negative	1
2	1	3	O.T. equal to tuberculin fraction	6
8	6	11	Total.....	25

Concerning a judgment regarding tuberculous infection, the reactions with O.T. showed a satisfactory correlation of the tests with clinical data. From the standpoint of clinical activity or disease, however, the T.E. appeared to outweigh the O.T. as a diagnostic agent. Similar results have been obtained in another series of more than 100 patients with healed primary foci and tuberculous cervical adenitis.

It would follow from our observations that a diagnosis of healed tuberculous cervical adenitis or of a healed primary focus in the lungs cannot be made with certainty in the absence of a definitely marked positive reaction to O.T.

In the following tables the complete results are summarized:

*Skin reactions*

	O. T. GREATER THAN T. E.	O. T. SMALLER THAN T. E.	O. T. POSITIVE; T. E. NEGATIVE	O. T. NEGATIVE; T. E. POSITIVE	O. T. EQUAL TO T. E.
Tuberculous groups (127).....	61 (48%)	22 (17.3%)	12 (9.4%)		32 (25.3%)
Nontuberculous groups (111).....	27 (24.3%)	17 (15.3%)	19 (17.1%)	7 (6.4%)	41 (36.9%)

The significance of these comparative skin reactions is evidently in favor of the T.E. when it is remembered that 50 patients, or 39.3 per cent of the entire tuberculous group, represented a clinically healed or clinically normal condition without any other manifestations. Yet the O.T. gave stronger reactions than T.E. in 57.4 per cent of the total number of cases. In the nontuberculous group O.T. gave stronger reactions in 41.4 per cent of the cases, again suggesting an erroneous interpretation of the clinical picture. Similarly, the occurrence of negative tests with T.E. when O.T. was positive pointed again to better correlation on the part of the T.E. with the clinical observations. The tests with T.E. and O.T. were the same in 36.9 per cent of the cases in the nontuberculous group and here also the clinical analyses favored the T.E. as a criterion. Reference to the summaries under the corresponding headings will show these facts in clearer detail.

SKIN REACTION	DOUBTFUL (A) OR NEGATIVE				MODERATELY POSITIVE (C) AND STRONGLY POSITIVE (D)			
	Fraction	Per cent	O. T.	Per cent	Fraction	Per cent	O. T.	Per cent
Tuberculous.....	14	16.7	3	3.6	38	45.2	66	78.5
Nontuberculous.....	62	40.0	35	22.5	57	36.8	71	61.7

Comparisons of the tests with tuberculin fraction and O.T indicate that the former gave a doubtful or negative reaction more frequently in the tuberculous group in the ratio of approximately 4.5 to 1, and in the nontuberculous group of 1.7 to 1. A moderately positive to strongly positive reaction was given more frequently by the O.T. in the tubercu-



TABLE 8

*Evaluation of skin reactions according to degree and in terms of selective grouping by O.T. and tuberculin fraction among contacts and noncontacts*

TOTAL CONTACTS	TESTS WITH FRACTION	PER CENT WITH FRACTION	PER CENT WITH O.T.	GROUP*	TOTAL NON-CONTACTS	TESTS WITH FRACTION	PER CENT WITH FRACTION	PER CENT WITH O.T.
29	19	65.5	34.5	A	21	15	71.4	28.6
66	34	51.5	48.5	B	50	25	50.9	49.1
37	22	59.4	40.6	C	43	22	51.2	48.8
62	18	29.2	70.8	D	47	14	29.8	70.2
24	16	66.7	33.3	Neg.	31	20	64.5	35.5

\* A, B, C, D, Negative = degree of skin reaction, respecting doubtful, slightly positive, moderately positive, and intense or negative.

TABLE 9

*Distribution of tuberculous and nontuberculous cases according to contacts and noncontacts and degree of skin reaction*

SKIN REACTION	FRACTION		DIAGNOSIS	O.T.	
	Contact	Noncontact		Contact	Noncontact
A	6	1	Tuberculous	3	0
	14	14	Nontuberculous	10	6
B	21	11	Tuberculous	11	4
	20	16	Nontuberculous	26	23
C	10	9	Tuberculous	12	7
	19	15	Nontuberculous	17	13
D	15	4	Tuberculous	32	15
	11	12	Nontuberculous	20	21
Neg.	6	1	Tuberculous	0	0
	17	17	Nontuberculous	7	12

*Cases tabulated without distinction as to contact or noncontact*

TUBERCULIN FRACTION	O.T.	SKIN REACTION	DIAGNOSIS
7	3	A	Tuberculous
28	16		Nontuberculous
32	15	B	Tuberculous
36	49		Nontuberculous
19	19	C	Tuberculous
34	30		Nontuberculous
19	47	D	Tuberculous
23	41		Nontuberculous
7	0	Negative	Tuberculous
34	19		Nontuberculous

TABLE 10

*Tuberculous and nontuberculous series of patients with reference to degree of skin reaction and frequency*

	O. T. GREATER THAN T. E.			O. T. SMALLER THAN T. E.			O. T. POSITIVE; T. E. NEGATIVE				O. T. EQUAL TO T. E.					O. T. NEGATIVE; T. E. POSITIVE				TOTAL
	D	C	B	A	B	C	D	C	B	A	D	C	B	A	Neg.	A	B	C	D	
<i>Tuberculous groups:</i>																				
Tuberculosis of bronchial lymph nodes.....	16	3	2	3	2			1	1		6	4	1							39
Total.....		(21)			(5)			(2)				(11)								
Tuberculous cervical adenitis.....	4	2									1	1								
Tuberculosis of bones.	3				2						1									25
Healed primary focus.	5				1	1					2	2								
Total.....		(14)			(4)							(7)								
Pulmonary tubercu- losis.....	4					3	1	1	1		1		1							12
Total.....		(4)			(3)			(3)				(2)								
Peribronchial tuber- culosis.....	1	1	1	1	1			1			2									8
Total.....		(3)			(2)			(1)				(2)								
Clinically normal. . .	10	5	4	2	4	2	2	1	1	1	4	1	6							43
Total.....		(19)			(8)			(5)				(11)								
Total.....		61			22			11				33								127
<i>Nontuberculous groups:</i>																				
Enlarged bronchial lymph nodes. . . . .	12	5	3	7	7	1	2	3	7		7	5	8	4	1					72
Total.....		(20)			(15)			(12)				(25)								
Nontuberculous lung disease.....	3	1	3	1	1		2	1	4		1	2	1	2						22
Total.....		(7)			(2)			(7)				(6)								
Negative O.T. group.															10	3	2		2	17
Total.....												(10)				(7)				
Total.....		27			17			19				41				7				111

lous group in the proportion of 1.7 to 1, and in the nontuberculous group of 1.8 to 1.

The diagnostic significance of the test with the tuberculin fraction becomes more evident in considering that actually only 29.8 per cent of

TABLE 11

DIAGNOSIS	CONTACT	NONCONTACT	DOUBTFUL	O. T. POSITIVE; T. E. POSITIVE	O. T. POSITIVE; T. E. NEGATIVE	O. T. NEGATIVE; T. E. POSITIVE	O. T. NEGATIVE; T. E. NEGATIVE	TOTAL
Hilum and peribronchial tuberculosis.....	16	2		13	2(a)	2	1	18
Mediastinal tuberculosis.....	4	2		3		3		6
Pulmonary tuberculosis.....	1		1	1		1		2
Primary focus.....	2		1	1	1(b)	1		3
Total.....				18	3	7	1	29
Chronic nasal infection; "scrofulous diathesis".....	3	9	2	8		3(c)	3	14
Bronchiectasis.....		1				1		1
Pulmonary abscess.....		1				1		1
Bronchitis.....		2		1	1(d)			2
Asthma.....		2		1		1		2
Malnutrition and underweight..		3		1		2		3
Total.....	26	22	4	11	1	8	3	23
Undiagnosed.....		1	2	1		1	1	3
Total.....	26	23	6	1		1	1	55
Associated diagnosis.....	5	3	1					9
	21	20	5					46

(a) Not clinically active.

(b) Completely healed primary focus.

(c) Tuberculosis suspected or associated. (Mediastinal tuberculosis.)

(d) No tuberculosis present.

the cases in the tuberculous group showed clinical manifestations or suggested tuberculous disease. In the nontuberculous group the skin reactions with the tuberculin fraction were decidedly superior from the diagnostic standpoint. (Tables 8, 9 and 10.)

## SUPPLEMENTARY SERIES

In a group of 46 patients ranging from  $2\frac{1}{2}$  to 13 years of age, the comparative intracutaneous skin tests made with O.T and T.E. resulted similarly to those described in the larger series. This additional group has been added primarily to record the results of some tests in which O.T. and T.E. were simultaneously used for retesting patients who had been previously tested with O.T. alone. For this material the writers are indebted to Dr. Chesley Bush, Superintendent and Medical Director of the Arroyo Sanatorium, Livermore, California, under whose direction the tests were made by his associates, Drs. Ianne and Brier. As the subjoined table shows, the reactions with T.E. compared with O.T. were better correlated in the presence of clinical findings suggested by or associated with tuberculosis. (Table 11.)

Of particular interest was the group of 12 patients who were retested with O.T. and T.E. 1 to  $11\frac{1}{2}$  months after the first test with O.T., seven after 1 to 3 months, four after 6 to  $7\frac{1}{2}$  months, and one after  $11\frac{1}{2}$  months. There were 6 patients who had reacted negatively to O.T. and the others had shown slightly to moderately positive tests. The T.E. uniformly resulted in more marked reactions, that were usually four, five and even ten times as great in area and intensity compared with the simultaneously retested O.T. The amount of tuberculin used was 0.1 mgm. in all cases.

It was concluded that a tuberculin test with T.E. should be considered positive if it measured more than  $5 \times 5$  mm. and the control test was negative, even when the reaction had faded completely 48-72 hours later. A test that did not fade would be interpreted as indicating more or less allergy. (Table 12.)

The question of the possible effect exerted by a previous injection of tuberculin upon the development of a stronger reaction to a subsequent injection (21) did not affect these results, as the comparative tests indicate. Sufficient time had elapsed between retesting to preclude the enhancement of reaction which might have occurred when O.T was used. For, with reference to the T.E., this factor was of no moment because sensitization to products in the culture media could not have taken place. It is important that we distinguish between specific and nonspecific reactions following repeated injections of substances containing tuberculin along with protein from culture media. This criticism cannot be applied to the use of "synthetic" nonprotein media, in which the products of the tubercle bacillus are elaborated without reference to foreign



TABLE 12

FIRST TEST WITH OLD TUBERCULIN	DIAGNOSIS	RETEST WITH OLD TUBERCULIN*	RETEST WITH TUBERCULIN FRACTION (T.E.)
Patient J. S., noncontact, age 12, 10-5-27 negative	Hilum and peribronchial tuberculosis (active)	11-2-27: 19 x 15 mm.; 48 hours, 5 x 5 mm., fading; 72 hours, negative. 1 month.*	11-2-27: 35 x 20 mm.; 48 hours, 12 x 18 mm. 24-hour control, negative
Patient D. C., contact, age 7, 7-27-27 negative	Hilum and peribronchial tuberculosis	11-2-27: 7 x 10 mm. with induration; 48 hours, 5 x 6 mm., faded; 72 hours, negative 3 months	11-2-27: 31 x 19 mm.; 48 hours, 8 x 8 mm., fading; 72 hours, negative. 48-hour controls negative
Patient V. G., contact, age 7, 4-27-27 negative	Hilum and peribronchial tuberculosis	11-2-27: 20 x 19 mm. with moderate induration; 48 hours, 5 x 7 mm.; 72 hours, 6 x 6 mm. 6½ months	11-2-27: 22 x 27 mm. with marked induration; 48 hours, 8 x 12 mm.; 72 hours, 7 x 8 mm. 24-hour controls, 5 x 5 mm.
Patient L. V., noncontact, age 10, 10-12-27 negative	Asthma (?)	11-2-27: 8 x 10 mm.; 48 hours, 5 x 6 mm., fading; 72 hours, 5 x 5 mm., pale 3 weeks	11-2-27: 10 x 10 mm.; 48 hours, 7 x 8 mm. with definite marked induration; 72 hours, 6 x 7 mm. 24-hour controls negative
Patient L. F., contact, age 12, 5-5-27 negative	Hilum and peribronchial tuberculosis	11-2-27: 6 x 7 mm.; 48 and 72 hours, negative 6 months	11-2-27: 23 x 20 mm. with profound induration; 48 hours, 6 x 8 mm.; 72 hours, 6 x 8 mm., pale. 24-hour controls, negative
Patient H. S. H., noncontact, age 11, 7-27-27 negative	Chronic nasal infection; urticaria. ("Scrofulous diathesis")	11-2-27: 13 x 16 mm.; 48 hours and 72 hours, negative 3 months	11-2-27: 25 x 20 mm. with definite induration; 48 hours, negative; 72 hours, negative. 24-hour controls, 5 x 5 mm.

Patient D. T., contact, age 9, 3-16-27, 4 x 4 mm.	Hilum and peribronchial tuber- culosis	11-2-27: 6 x 6 mm.; 48 hours, 5 x 5 mm., pale; 72 hours negative 7½ months	11-2-27: 30 x 18 mm.; 48 hours, 8 x 8 mm.; 72 hours, 4 x 6 mm. with slight induration. 24-hour controls negative
Patient L. S., noncontact, age 12, 3-30-27, 12 x 14 mm.		11-2-27: 3 x 3 mm.; 48 hours and 72 hours, negative 7 months	11-2-27: 20 x 15 mm.; 48 and 72 hours, negative. 24-hour controls negative
Patient L. P., contact, age 7, 8-17-27, 8 x 9 mm., pale	Hilum and peribronchial tuber- culosis	11-2-27: 17 x 15 mm.; 48 hours, 5 x 4 mm., fading; 72 hours, negative 2½ months	11-2-27: 22 x 19 mm. with marked induration; 48 hours, 7 x 9 mm.; 72 hours, 7 x 8 mm. 24-hour controls negative
Patient T. T., noncontact, age 13, 9-7-27, 7 x 11 mm., pale	Chronic nasal infection. ("Scrofulous diathesis")	11-2-27: 16 x 20 mm. with marked induration; 48 hours, 6 x 6 mm., fading; 72 hours, 6 x 7 mm., pale 2 months	11-2-27: 38 x 20 mm.; 48 hours, 6 x 8 mm. with marked induration; 72 hours, 6 x 8 mm., pale. 24-hour controls negative
Patient P. S., noncontact, age 9, 12-20-26, 8 x 9 mm.	Chronic nasal infection. ("Scrofulous diathesis")	11-2-27: 3 x 2 mm.; 48 and 72 hours, negative 11½ months	11-2-27: 37 x 20 mm. with marked induration; 48 hours, 8 x 8 mm. with induration; 72 hours, 10 x 10 mm. 24- hour controls negative
Patient J. I., noncontact, age 9, 9-7-27, 5 x 5 mm.	Chronic nasal infection. ("Scrofulous diathesis")	11-2-27: 4 x 6 mm.; 48 hours, 4 x 5 mm.; 72 hours, 4 x 6 mm. 2 months	11-2-27: 20 x 20 mm. with marked induration; 48 hours, 10 x 10 mm. with deep induration; 72 hours 9 x 8 mm. 24-hour controls negative

\* Time elapsed between tests.

proteins. In this instance sensitization that might develop from repeated injections of T.E. would indicate a specific response to the bacillary substances. Only in this sense, therefore, could it be correctly stated that sensitization to tuberculin might occur.

#### DISCUSSION AND SUMMARY

In the evaluation of comparative skin reactions for tuberculosis, two points might be considered; first, the diagnostic value in relation to tuberculous infection, and, second, the relation to clinical disease. The supposition might be made that a strong test is to be associated with clinical activity and the weak or negative one be not so associated. The diagnostic superiority of a test would appear to rest in its ability to give a stronger reaction when only clinical disease existed to the exclusion of any cases with old, healed foci. As a corollary to this point, when a strong reaction with O.T. might lead one to believe that a weak reaction is valueless, the fractional tuberculin in such a case might give better information because the correlated results tend to show that nonclinical tuberculosis may be differentiated from tuberculous disease. In our experience the fractional tuberculin has never failed to give unequivocally positive results in definite tuberculous disease.

Three hundred and forty-six tuberculous and nontuberculous patients, ranging in age from seven months to sixteen years, have been studied with a view to comparing tuberculin reactions with specially prepared fractions of tuberculin. The cases have been divided into various groups to test more rigorously the diagnostic value of the tuberculin fractions. To this end borderline groups, presenting unusual difficulty in diagnosis, were selected. Stress was laid particularly upon healed infections. The chief differences in the reactions in those cases pointed to lesser reactivity on the part of the tuberculin fractions in latent conditions in which O.T. gave moderate or marked reactions. The results indicate also that a diagnosis of healed tuberculous cervical adenitis or of a healed primary focus cannot be made with certainty in the absence of a definitely marked positive reaction to O.T.

Tuberculin fractions did not give negative tests when O.T. was positive in patients having symptoms that might be considered as those of tuberculous activity. In all the cases in which the tuberculin fraction gave reactions equal to those with O.T., when it showed medium or strong tests, or in cases in which the fraction gave medium to strong and O.T. at the same time gave weak to doubtful results, symptoms and signs

were present in the history that might have been attributable to tuberculous activity.

In a clinically normal group, equally divided between contact and non-contact patients with tuberculous infection but without any active process, the marked O.T. reactions gave information that was not consistent with the clinical picture. In these instances, the lesser reactivity or negative results with the tuberculin fraction might be more significant, particularly when negative results give more information.

In a paper that is now being prepared there will be presented the detailed analysis and evaluation of the symptoms, signs and clinical observations made in these same groups of patients with special reference to diagnoses and the skin reactions.

#### CONCLUSION

From detailed analyses of the different tuberculous and nontuberculous groups presented, it can be concluded that the tuberculin preparation, a fraction described as T.E. (alcohol- and ether-insoluble), gives better results in our hands than ordinary O.T. and is more selective as a clinical test. The preparation and use of this tuberculin fraction are described and discussed.

#### REFERENCES

- (1) EBERSON, F.: Amer. Rev. Tuberc., 1925, x, 681; 1926, xiii, 454; Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 1925, xxii, 346.
- (2) JOHNSON, T. B.: Amer. Rev. Tuberc., 1926, xiv, 30; Tubercle, 1926, vii, 564.
- (3) ANDERSON, R. J.: Jour. Biol. Chem., 1927, lxxiv, 525.
- (4) LONG, E. R.: Amer. Rev. Tuberc., 1926, xiii, 393, 398, 404, 408, 431, 441, 448; Tubercle, 1926, viii, 111; Jour. Am. Med. Assoc., 1925, lxxxv, 650.
- (5) PETROFF, S. A.: Journ. Immunol., 1925, x, 677; 1926, xii, 97.
- (6) GORIS, A.: Ann. l'Inst. Pasteur, 1920, xxxiv, 49.
- (7) EBERSON, F.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 1926, xxiii, 508; Amer. Rev. Tuberc., 1926, xiii, 454.
- (8) LONG, E. R.: Amer. Rev. Tuberc., 1923, vii, 642.
- (9) NÈGRE, L., AND BOQUET, A.: Compt. Rend. Soc. Biol., 1922, lxxxvi, 653.
- (10) BOQUET, A., AND NÈGRE, L.: Ibid., 1922, lxxxvi, 717.
- (11) MASSIAS, C.: Ibid., 1922, lxxxvii, 1279.
- (12) PINNER, M.: Amer. Rev. Tuberc., 1926, xiv, 23.
- (13) ZINSSER, H.: J. Exp. Med., 1925, xli, 159; J. Immunol., 1924, ix, 85.
- (14) MUELLER, J. H.: J. Exp. Med., 1926, xliii, 1, 9.
- (15) GESSARD, C., AND VAUDREMER, A.: Compt. Rend., Soc. Biol., 1922, lxxxvii, 1012.
- (16) EBERSON, F.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 1925, xxii, 346.
- (17) KÜHNE: Zeitschr. Biol., 1894, xxx, 221.
- (18) RUPPEL AND RICKMANN: Zeitschr. f. Immunitätsf. (Orig.), 1910, vi, 344.
- (19) LÖWENSTEIN AND PICK: Biochem. Zeitschr., 1911, xxxi, 145.
- (20) LONG, E. R.: Tubercle, 1924, vi, 128.
- (21) WHITE, W. C., AND VAN NORMAN, K. H.: Arch. Int. Med., 1910, vi, 449.





## CLINICAL STUDY OF TUBERCULIN FRACTIONS PREPARED FROM NONPROTEIN CULTURE MEDIA\*

By FREDERICK EBERSON, M. D.

AND

ERNST WOLFF, M. D.

San Francisco

Read before the California Medical Association at the Fifty-Seventh Session, April 30 to May 3, 1928.  
Presented by Chesley Bush, M. D., Livermore; F. M. Er, M. D., Monrovia; A. L. Bramkamp, M. D., San Francisco.

This report is presented a comparative study of skin reactions made with old tuberculin and a new fraction of tuberculin prepared from a synthetic nonprotein culture medium in which the bacilli had been cultivated. The fractional tuberculin has already been described in detail and with its use reported in earlier publications. The apparent advantage of such a substitution for diagnostic purposes lies in its freedom from nonspecific irritating components and from impurities that are unrelated to the tubercle bacillus itself.

In studying the efficacy of test materials it is inefficient to compare the reactions without a basic standard. It would seem more important to analyze the observed discrepancies in terms of a carefully evaluated group of clinical symptoms, signs, and auxiliary laboratory data and to correlate the observations to the patient, who must be considered as the standard.

### CLASSIFICATION OF CLINICAL MATERIAL

The diagnosis of juvenile tuberculosis presents difficulties of which the greatest, perhaps, is that large borderline group of patients having symptoms and signs which generally render them a tuberculosis suspect. There is doubt, however, that the so-called symptom-complex of tuberculosis in childhood is by any means a fixed entity and can as such be used as a basis for diagnosis. An attempt was made, therefore, in our study to subject all the available data to an exhaustive analysis with the aim of correlating wherever possible the numerous variables most likely to confuse the picture. By this method we were able to compare the different skin reactions of definite variables that occurred in the different groups chosen for study.

Read before the Pathology and Bacteriology Section of the California Medical Association at the Fifty-Seventh Session, April 30 to May 3, 1928.

This investigation was aided by a grant from the San Francisco Tuberculosis Association and the California Tuberculosis Association and the Medical Research Council of the University of California.

Our classification, as a point of departure, was based upon the complete clinical examination, history, and x-ray findings, with the results of old tuberculin (O. T.) tests as a tentative gauge for comparison with the tuberculin fractions.

### SYMPTOMS

The symptoms considered were loss of weight, or failure to gain, lack of appetite, fatigability, cough, night sweats, lassitude, nervousness, and elevation of temperature.

### CLINICAL FINDINGS

The points considered were malnutrition, tuberculous adenitis, involvement of bone, enlarged cervical lymph nodes, phlyctenular processes and percussion and auscultation findings.

### DIAGNOSIS AND CLINICAL IMPRESSION

The tuberculous group comprised pulmonary tuberculosis, bronchial lymph node tuberculosis, tuberculous cervical adenitis, healed primary focus, tuberculosis of bones and peribronchial tuberculosis. The nontuberculous group included enlarged bronchial glands, nontuberculous lung disease, clinically normal patients, the three named having positive tuberculin tests (O. T.), and a group with negative tuberculin tests and likewise free from tuberculous manifestations.

In all the groups attention was paid to associated diagnoses in every case, so that the possible effect upon tuberculin reactions of complicating clinical conditions might be properly interpreted.

### ROENTGENOGRAM FINDINGS

Chest films were diagnosed under the headings of primary focus, calcified bronchial glands, hilum calcification, peribronchial infiltration, enlarged bronchial glands, increased bronchial markings, parenchymal tuberculosis, thickened interlobar pleura, thickened apical pleura, and negative.

### CONTACT AND NONCONTACT HISTORY

The history of definite exposure to and contact with tuberculosis was ascertained as accurately as possible. It is evident that the greatest source of error is found in the so-called noncontact case, owing to our inability to check this point in children beyond the nursery age. For practical purposes, however, this division into two groups may be of interest if it be not of definitely proved value.

### INTRADERMAL TUBERCULIN TESTS

Comparative tests were made with human old tuberculin and tuberculin fraction, using a fixed dilution equivalent to 0.1 milligram of tuberculin substance. Suitable controls were made with salt solution and culture media from which the tuberculins had been prepared. The simultaneous injections were observed at twenty-four, forty-eight and seventy-two-hour intervals, and in most cases

until the visible skin reaction had disappeared. The areas were measured and the degree of infiltration and reddening noted. For roughly quantitative purposes the reactions were classified as follows:

A. Doubtful test, with area less than 0.5 by 0.5 cm. without reddening or infiltration and fading within twenty-four hours.

B. Slightly positive test, with area 0.5 by 0.5 to 1.0 by 1.0 cm., without definite reddening or infiltration or with slight reddening only and persisting twenty-four hours.

C. Moderately positive test, with area 1.0 by 1.0 cm. with slight to moderate reddening and infiltration and persisting forty-eight hours.

D. Strongly positive test, with area 2.0 by 2.0 cm. or more, with profound reddening and infiltration and persisting more than forty-eight hours.

Negative—areas too small and too transitory to be considered under the doubtful Group A.

The skin reactions were classified further with reference to agreement or disagreement of the comparative tuberculin and fractional tests. Five subdivisions were made:

1. Old tuberculin negative, and fraction positive.
2. Old tuberculin positive, and fraction negative.
3. Old tuberculin same as fraction.
4. Old tuberculin weaker than fraction.
5. Old tuberculin stronger than fraction.

In each of these groups the preceding grades of reaction (A, B, C, D, negative) were noted, so that every possible relation of one test to the other might be visualized.

We were able in the majority of patients to study comparative reactions for two to three years and in a considerable number for four years.

#### SUMMARY OF RESULTS

*Bronchial Gland Tuberculosis.*—There were thirty-nine patients in this group which included twenty-seven contacts and twelve noncontacts. Clinically this group represented a healed condition to which thirty-one cases belonged definitely, under the heading of healed bronchial gland tuberculosis without any other manifestations. Of the contacts, in fourteen, old tuberculin gave a stronger reaction than the fraction, six the same, five weaker than the fraction, and two positive when fractions were negative. In this last group one patient was clinically normal and had enlarged bronchial glands with some calcification, and the other had enlarged but not indubitably tuberculous glands. Of the noncontacts there were seven with old tuberculin stronger than fraction, and five with the same reaction as fraction. In the healed group without other manifestations in which the old tuberculin reactions were stronger, there were eleven contacts and five noncontacts. In these sixteen tests fourteen were strong, eleven falling in the D classification, whereas the fractional tests ranged from doubtful (two) to weak (seven). The results showed eighteen tests definitely or strongly positive when the fractions were doubt-

fully positive, weak, or negative. When old tuberculin and fractions gave similar results there was agreement in eight cases. In the group of actions with fraction giving a stronger reaction to old tuberculin, five fell in the clinical subcategory of definitely healed bronchial gland tuberculosis without other manifestations, and of these three were dubious and two, weak.

*Tuberculous Cervical Adenitis, Healed.*  
*Focus, Tuberculosis of Bones.*—In a group of twenty-five cases with definite evidence of tuberculous infection and healed tuberculous cervical adenitis there were eight tuberculous cervical adenitis, tuberculosis of the bone, and eleven healed primary foci. Old tuberculin gave a reaction in but four of twenty-five cases, medium to marked reactions, and the fraction gave in all cases a medium or strong reaction. Concealment of judgment regarding tuberculous infection, in actions with old tuberculin showed a satisfactory correlation of the tests and clinical data. From the standpoint of clinical activity or diagnosis, the fractions appeared to outweigh the old tuberculin as a diagnostic agent. Similar results have been obtained in another series of more than one hundred patients with healed primary foci and tuberculous cervical adenitis.

It would appear from our observations that the diagnosis of healed tuberculous cervical adenitis or of a healed primary focus in the lungs can be made with certainty in the absence of a definitely marked positive reaction to old tuberculin.

*Enlarged Bronchial Glands.*—In this group there were considered:

A. Enlarged bronchial glands with positive reaction to old tuberculin.

B. Enlarged bronchial glands associated with bronchial gland tuberculosis.

C. Enlarged bronchial glands associated with tuberculous cervical adenitis.

D. Enlarged bronchial glands associated with peribronchial tuberculosis.

E. Enlarged bronchial glands associated with tuberculous tenular processes.

F. Enlarged bronchial glands associated with tuberculous calcifications.

G. Enlarged bronchial glands associated with tuberculous calcifications.

In this group sixty-one of the seventy-two tests were negative for clinical signs of tuberculosis, and of these, nine gave complaints such as cough, fatigue, and the like. The reaction in this group were as follows: Old tuberculin was stronger than the fraction in seventeen cases; old tuberculin was positive when the fraction was negative in ten cases, or a total of twenty-seven (44 per cent) in which the old tuberculin test was dominant. Of these twenty-seven tests sixteen were moderately to very strongly positive (C). In contrast, five tests with the fraction were weakly positive (B) and six were negative (A) and six moderately strong. The frac-



than old tuberculin in twelve cases and six were doubtful, five weakly positive, moderately positive.

significant that the fractions did not give tests when tuberculin was positive in the symptoms that might be construed as tuberculous activity.

*Tuberculous Pulmonary Disease.*—There were thirteen cases in which old tuberculin gave a greater reaction than the fraction or was negative when the fraction was negative. Sixteen of twenty-two in the entire group were non-contacts among whom were ten with old tuberculin dominating or positive when the fraction was negative. When old tuberculin was stronger, with fractions were doubtful in five instances (A), slightly positive (B) in two, and by the old tuberculin reactions were marked in three cases, definitely positive (C) in one, and slightly positive (B) in three.

In the cases where fractions gave reactions with old tuberculin, showing medium or strong, or in the cases where fractions gave to strong tests and old tuberculin at the same time gave weak to doubtful results, symptoms and signs were present in the history that have been attributable to tuberculous activity, we believe, would appear to be of some value.

*Clinically Normal Group.*—This group was divided into (a) clinically normal without pathologic changes, but with a positive tuberculin test; (b) clinically normal with small hilum calcification and positive old tuberculin; (c) clinically normal with definite signs of healed tuberculous

in twenty-five of this clinically normal group gave greater reactions with old tuberculin than with fractions, and in two cases in addition, tuberculin tests were obtained, when fractions reacted negatively. It may be noted that in a group of twelve, seven were contacts and five noncontacts. In the entire group of twenty-five, there were contacts and eleven noncontacts.

*Group:* Five out of eleven gave a greater reaction with old tuberculin than with fractions. In addition three cases were positive when the fraction was negative. In this group of eleven, there were contacts and nine noncontacts, and in a group of eight reactors, one was a contact and seven were noncontact.

*Group:* Four out of seven in this group gave a greater reaction with old tuberculin than with fractions. In this group of four, one was non-contact and three were contact.

The clinical group as a whole, numbering forty-six cases, was divided almost equally between contacts and noncontact patients, there being

twenty-two of the former and twenty-one of the latter.

Inasmuch as this group comprises cases with tuberculous infection but without any active process, the marked old tuberculin reaction gives information that is not consistent with the clinical picture. We are more concerned in a group of this type with the relation that the test might bear to the significant clinical data. In this connection the lesser reactivity of the tuberculin fraction might appear to have more significance, particularly when negative results are more informative.

*Negative Tuberculin Test.*—In this group of seventeen cases with negative old tuberculin reactions, ten were likewise negative with fractional tuberculin. Of the remaining seven, three gave a doubtful test, two a weakly positive, and two (contacts) gave a strong reaction. In addition these two patients showed a record of a positive old tuberculin test in the previous history. In all these cases symptoms and signs were present suggesting a possible old infection.

*Pulmonary Tuberculosis and Peribronchial Tuberculosis.*—In these groups, numbering twenty patients, no special differentiating characteristics of the test substances could be discerned. However, since these groups were too small for detailed study and correlation it did not seem advisable to draw any conclusions. In our opinion the value of a comparative study with the test substances under consideration can be better determined by devoting attention to the clinical groups of patients that present vague or indefinite clinical conditions that might be mistaken for tuberculosis.

#### DISCUSSION AND SUMMARY

In the evaluation of comparative skin reactions for tuberculosis two points might be considered: first, the diagnostic value in relation to tuberculous infection, and second, the relation to clinical disease. The supposition might be made that a strong test is to be associated with clinical activity and the weak or negative one be not so associated. The diagnostic superiority of a test would appear to rest in its ability to give a stronger reaction where only clinical disease existed to the exclusion of any cases with old, healed foci. As a corollary to this point, when a strong reaction with old tuberculin might lead one to believe that a weak reaction is valueless, the fractional tuberculin in such a case might give better information because the correlated results tend to show that nonclinical tuberculosis may be differentiated from tuberculous disease. In our experience the fractional tuberculin has never failed to give unequivocally positive results in definite tuberculous disease.

Three hundred and forty-six tuberculous and nontuberculous patients, ranging in age from seven months to sixteen years, have been studied with a view to comparing tuberculin reactions with



specially prepared fractions of tuberculin. The cases have been divided into various groups to test more rigorously the diagnostic value of the tuberculin fractions. To this end, borderline groups presenting unusual difficulty in diagnosis were selected. Stress was laid particularly upon healed infections. The chief differences in the reactions in those cases pointed to lesser reactivity on the part of tuberculin fractions in latent conditions in which old tuberculin gave moderate or marked reactions. The results indicate that a diagnosis of healed tuberculous cervical adenitis or of a healed primary focus cannot be made with certainty in the absence of a definitely marked positive reaction to old tuberculin.

Tuberculin fractions did not give negative tests when old tuberculin was positive in cases having symptoms that might be considered as those of tuberculous activity. In all the cases where tuberculin fraction gave reactions equal to those with old tuberculin when it showed medium or strong tests, or in cases where the fraction gave medium to strong and old tuberculin at the same time gave weak to doubtful results, symptoms and signs were present in the history that might have been attributable to tuberculous activity.

From detailed analyses of the different tuberculous and nontuberculous groups presented it can be concluded that the tuberculin fraction (T. E.) gives better results than old tuberculin, and is more selective as a clinical test.

In a clinically normal group equally divided between contact and noncontact patients with tuberculous infection but without any active process, the marked old tuberculin reactions gave information that was not consistent with the clinical picture. In these instances the lesser reactivity or negative results with the tuberculin fraction might be more significant, particularly when negative results are more informative.

Further studies of the type here presented are now under way, but at this writing lack the correlation necessary to enlarge these groups.

Note: Complete data will be published at a later date.

University of California Medical School.

#### REFERENCE

1. Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 1926, 23, 508; Am. Rev. of Tuber., 1926, 13, 454.

#### DISCUSSION

CHESLEY BUSH, M.D. (Arroyo Sanatorium, Livermore).—This is certainly a praiseworthy attempt to evaluate the clinical usefulness of a tuberculin fraction prepared from a nonprotein culture medium. The difficulties of making such a test are tremendous. Our knowledge of tuberculosis in children is as yet too hazy to admit of rigid classifications, and although Koch's old tuberculin has been on the market for over a quarter of a century, we are still doubtful about its interpretation in many cases.

Attempts to produce a substance that will indicate

clinical activity rather than simple infection is numerous in the past few years, but all disappear. Such a substance if reliable would be of infinite value.

✱

F. M. POTTENGER, M.D. (Monrovia).—As a result of immunological studies we are now beginning to get a more accurate idea of the nature of clinical tuberculosis. The clinical picture and the underlying pathologic changes are all due to the interplay between the tubercle bacilli, on the one hand, and the cellular reaction of the patient, on the other hand. The various tuberculin tests more or less crudely represent that part of the tubercle bacillus which is responsible for the sensitizing and immunizing mechanism which is set up in a tuberculous infection. Believing that it is more advantageous if the particular activating principle could be isolated, Long and his coworkers have been working on this for some time, and have prepared a tuberculin by growing bacilli on a nonprotein medium, thus eliminating the protein of the culture. This is Koch's original preparation. They have also prepared a water-soluble protein, which they have shown to have the antigenic principles of tuberculin.

In my own work with the tuberculin reaction, now extends over many years, I have found that skin sensitivity upon which the reaction depends varies greatly in people according to their general condition. The immunity reaction in tuberculosis is relative, and oscillates up and down. Sometimes it is much higher than at other times. Sometimes it entirely vanishes, even with patients who at the time harbor active infection. Theoretically it should be increased by each reinoculation, and it is the variations that make activity in tuberculosis so difficult to interpret. That different individuals develop different degrees of immunity, hence show different degrees of activity, and react differently to the same dose of tuberculin, even though their diseases be qualitatively and quantitatively much the same. It does not seem probable that uniformity of results can be expected since different individuals react differently to the same dose of tuberculin, unless there is some certain tuberculin reaction the presence of which is due alone to tuberculous infection. The difficulty of determining such a fact is increased by many difficulties. Just when a tuberculous infection is throwing out tubercle protein cannot be established by any of our present methods of examination. It must be evident to all of those who have the opportunity of studying patients suffering from clinical tuberculosis over a long period of time. Sometimes in some will give marked symptoms that point to definite clinical disease. Large lesions in the lungs produce no symptoms that are recognizable, and to me that herein lies one of the difficulties in interpreting the very thing that Doctor Ebersson and his coworkers are trying to establish. If, however, it were possible to isolate a principle from tuberculin that would differentiate active tuberculosis from latent tuberculosis, active lesions they will advance diagnosis far beyond what it is today, and particularly in the group of children and early juvenile tuberculosis. It is particularly in this group that some such method is needed.

✱

A. L. BRAMKAMP, M.D. (Banning).—This work of Doctor Ebersson is in line with present-day thought and effort to determine more definitely the role of the tubercle bacillus, and the part that the cellular constituent may play in the pathology of tuberculosis. Not that such thought and effort are new, for almost innumerable tuberculins are evident in the literature. Contrary, recently, however, varied applications of the methods of biological chemistry have been used, thus increasing understanding in the matter.

a fuller knowledge of the chemical composition of the tubercle bacillus, a separation of the constituents in pure form, and the determination of each gives interesting information, perhaps practically helpful means of diagnosis may be obtained. That the perfect antigen may be found in a single constituent or set of constituents of tuberculin, is almost too much to hope for. In this connection it is pertinent that other substances (*e. g.*, sodium succinyl gold compounds) are used with the same effect as tuberculin, namely, to bring about an inflammatory reaction, specific or nonspecific, focus of disease. Doctor Ebersson's work consists largely with tuberculin fractions as skin tests (prepared from tubercle bacilli grown on different media: an alcohol insoluble fraction, an ether soluble fraction, and an ether insoluble fraction). A number of years ago considerable interest was shown by the Much-Deycke partial antigens, which were intended for therapeutic use after skin-testing in order to determine the particular respects in which the patient's immunity was lacking. Doctor Ebersson separated four partial antigens: one, the water-soluble fraction; one, neutral fats soluble in ether; one, albuminous residue insoluble in its nature. The conception and practice of Much-Deycke never came into acceptance, and at this time we hear no more of it.

Nevertheless if these different views and efforts are substantiated in full, they have at least a measure of value and help to point the way for future investigation.

Doctor Ebersson's work is being followed with great interest and we are hoping for real advances in diagnostic methods as a result of his efforts.

✱

DRS EBERSON and WOLFF (closing).—The discussion covered the topic so thoroughly that our contribution to them must be a word of appreciation to Drs Bush, Pottenger and Bramkamp.

Frankly admitted that such an important problem indicated here cannot be solved in the short space of most five years—which we have thus far de-

voted to this clinical experimental investigation. However, it will be shown in our paper when it is published in full that a detailed clinical analysis of nearly 350 cases may be made more convincing when the material is evaluated by correlation and comparative studies.

We feel with Doctors Pottenger and Bush that there is great need for a preparation of tuberculin capable of differentiating active from latent and inactive tuberculous lesions. Although our results suggest that such a substance may be obtained, we are primarily interested in showing by comparative tests that the old tuberculin is certainly less efficient than the tuberculin fraction (T. E.) as a diagnostic agent.

That there have been and are now being produced numerous substitutes for old tuberculin is a healthy sign. What has been lacking, however, is a comprehensive study of clinical material with the newer preparations. We believe that several hundred patients studied thoroughly, and with the clinical and laboratory data properly analyzed, will give as cogent a demonstration as several thousand patients. Larger series over many years will naturally add confirming or refuting facts, but a scientific analysis of even a small group of cases can tell much.

The therapeutic value of tuberculin prepared from nonprotein culture media is suggested naturally. We have already had some experience with the T. E. (tuberculin fraction) in tuberculous choroiditis, resulting in a complete cure when old tuberculin, used similarly had failed to alter the clinical picture. Such a series would be of value, particularly when the therapy has been followed carefully in the eye clinic.

From the point of view of sensitization to the tuberculin product, it is important that we distinguish between specific and nonspecific reactions following repeated injections of substances containing tuberculin along with proteins from culture media. This criticism cannot be applied to the use of "synthetic" nonprotein media in which the products of tubercle bacilli are elaborated without reference to foreign proteins. In this instance sensitization that might develop from repeated injections of T. E. would indicate a specific response to the bacillary substances. Only in this sense, therefore, could it be correctly stated that sensitization to tuberculin might occur.



## THE SURGICAL TREATMENT OF LOWER TRACT TUBERCULOSIS, GENITAL AND VESICAL<sup>1</sup>

FRANK HINMAN

*San Francisco, California*

One of the prominent characteristics of genito-urinary tuberculosis is its tendency to spread from one part of the tract to the other. If the primary lesion is in the urinary tract it may spread to the genital; if in the genital, it tends to spread to the urinary tract. This marked tendency of disease to spread from one tract to the other in the male makes joint consideration of the two tracts advisable for proper treatment and cure. Renal tuberculosis in the male is more frequent than genital tuberculosis. The well recognized surgical treatment of renal tuberculosis as compared to the many points regarding the treatment of genital tuberculosis makes separate consideration of the latter a subject of particular importance. Both types of conditions may occur without any clinical evidence of tuberculosis elsewhere in the body but, because of the many types of involvement in both renal and genital tuberculosis, an analysis of the results obtained by different methods of treatment is extremely difficult and unsatisfactory. The following report is an effort to present as accurately as possible our own personal experience and results.

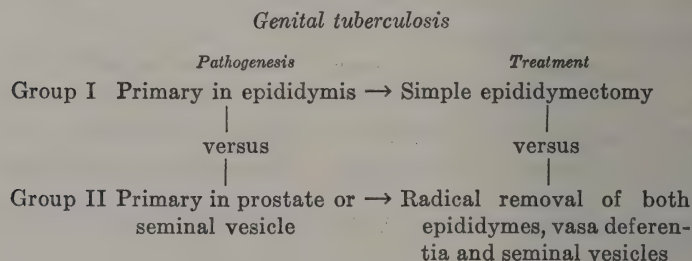
### INCIDENCE AND CHARACTERISTICS

It may be well to present first the facts that are generally recognized by all regarding the characteristics of genital tuberculosis. Genital tuberculosis does not seem to occur so frequently as renal tuberculosis and would seem to have an average incidence of 0.5 per cent, whereas the incidence of renal tuberculosis is variously estimated as from 1 to 5 per cent. But genital tuberculosis has

<sup>1</sup> Read at the annual meeting of the American Urological Association, Chicago, June, 1928.



one marked similarity to renal in that it frequently occurs as a primary lesion in the genital tract, there being no associated lesions elsewhere found. Barney's statistics show that 44.2 per cent of his carefully studied 154 cases were primary in that they showed no clinical evidence of tuberculosis elsewhere in the body. Of our own 51 cases of genital tuberculosis, only 20 were primary in the genital tract (39.4 per cent), the others being associated with active tuberculosis elsewhere. This tendency of the disease to be primary opens up the same argument for treatment as is held proven for renal tuberculosis. The important clinical fact in the treatment of renal tuberculosis is that the involvement begins in one kidney and that bilateral infection, except in cases of a miliary type, is invariably a late manifestation of the disease. Because of this, early nephrectomy effects a cure by preventing a spread of the disease to other parts of the tract. Careful analysis of statistics, both pathological and clinical, supports this view. But the application of this principle in the treatment of genital tuberculosis meets with decided opposition because of the marked difference of opinion as to the probable site of the primary lesion in the genital tract. Arguments and evidence are presented on the one hand that point to the epididymis as the primary focus and on the other hand good arguments and evidence may be presented strongly suggesting that the primary focus is in the seminal vesicle or prostate. This prolonged dispute has created two distinct problems in the diagnosis and treatment of genital tuberculosis, one with respect to its pathogenesis and the other with respect to treatment, the latter being largely influenced by one's views respecting the former. This controversy may be emphasized by the following diagram:



Before presenting our own analysis of cases, the arguments of each school might well be considered. Those who maintain that the epididymis is the common seat of primary tuberculosis in the genital tract base their belief on the following line of argument:

1. Primary tuberculous epididymitis frequently occurs independently.
2. When genital tuberculosis exists, generally the whole tract is involved, the spread being from the primary lesion in the epididymis.
3. The extent of a lesion can be taken as no criterion of its age, the advanced lesions not necessarily having priority in onset over less advanced lesions.
4. Involvement of the opposite epididymis may be hematogenous.
5. Existing lesions in an epididymis may have been overlooked in those cases reported as supposedly primary prostatic and vesicle.
6. Improvement or arrest clinically of the lesions recognized clinically in the vesicle and prostate occurs in the majority of cases following simple epididymectomy.
7. Tuberculosis of the seminal vesicle and prostate is rarely recognized clinically without involvement of the epididymis. Practically all cases seek relief for the epididymitis.

The above are facts that advocates of both sides of the question admit with more or less reservation. The strongest argument would seem to be that of improvement of the symptoms after simple epididymectomy. But, on the other hand, this cannot be regarded as in any sense proof that the lesion had been primary in the epididymis.

The arguments that are used by the other side may be best presented as clinical, pathological and experimental. The clinical facts that are presented as evidence that the primary focus is in the seminal vesicle or prostate are:

1. Tuberculous epididymitis alone is rare.
2. Clinical evidence of the presence of tuberculosis in the seminal vesicles or prostate, given by the presence of nodules, without evidence of disease in the epididymis is more frequent.
3. Symptoms of vesiculitis or prostatitis often precede the appearance of tuberculous epididymitis.
4. Whenever the epididymis is involved with tuberculosis, the initial lesion is in the globus minor and is analogous to acute infections known

to arise by extension from the urethra. When the disease spreads to the opposite epididymis, the globus minor is also first involved. From the globus minor it spreads to the body and globus major. In other words, every tuberculous epididymitis has 100 per cent involvement of the globus minor.

The pathological facts that are considered to support the belief that the lesion is primary in seminal vesicles or prostate are:

1. Lesions of the epididymis alone are rarely found at autopsy, whereas tuberculous lesions of seminal vesicles and prostate unaccompanied by lesions in the epididymis are frequently reported.

2. When the disease involves the whole genital tract, the lesions in the seminal vesicles and prostate generally have the appearance of being more advanced and older.

3. Lesions in the globus minor of the epididymis appear older and more advanced than those of the body or globus major. This portion is the first to soften and break down.

Certain experimental facts further support the belief that the primary lesion is in the seminal vesicle or prostate:

1. Microorganisms are repeatedly absorbed from the urethra and carried to the epididymis.

2. Tuberculous epididymitis has been produced experimentally by injuring the epididymis and then inoculating the urethra. The organism can travel by way of the lumen of the vas through antiperistalsis or by way of the lymphatics of the vas. (K. M. Walker.)

Discussion of this two-sided problem can lead to no definite conclusion. The above dispute has existed for many years without much modification. Genital tuberculosis was the main subject of discussion at the last International Congress of Urologists held in Brussels in 1927 and the arguments for and against were ably presented, for group 1, by J. Dellinger Barney and, for group 2, by Kenneth M. Walker of London. While admitting that the facts presented by those who argue for the primary lesion in the epididymis are more or less true, the writer inclines to consider the facts indicating the seminal vesicle and prostate as more probably primary to be the more valid. Hugh H. Young has



given this subject careful study for many years and has long been convinced from his clinical and surgical experience that the seminal vesicle or prostate is the primary focus of localization in the great majority of cases, and it is because of this belief that he has advocated radical methods of treatment. The following analysis of cases therefore is presented as a personal experience with the ideas and methods taught by Young.

#### ANALYSIS OF CASES

The personal cases that are analyzed below have one serious fault in that the follow-up records have been very incomplete, many of the cases being lost sight of after the initial treatment or diagnosis. They may be grouped into three classes: (1) Cases of tuberculous epididymitis without clinical evidence of vesiculitis or prostatitis; (2) cases in which the seminal vesicles were involved clinically but which were either untreated or treated by simple epididymectomy; and (3) cases of definite involvement of the seminal vesicles or prostate treated by radical operation.

##### *Group 1*

Cases of epididymitis without clinical evidence of vesiculitis, 17 cases; 11 treated by simple epididymectomy, 6 not treated surgically. Of the 17 cases, 5 have been lost from observation, 6 are alive and 6 are dead. Of the cases treated surgically, 4 had bilateral epididymectomy, 4 had right epididymectomy, and 3 left epididymectomy. Three of these 11 cases have had nephrectomy and 3 have been lost from observation. Answers from 4 of these cases, 1 eight years, 1 seven years, 1 three years and 1 five months after operation state that they are well and better than before operation. One case writes seven years later that he feels better but still has evidence of tuberculosis in the bladder and scrotum. Three cases have died since leaving the hospital, 2 of tuberculosis and the other apparently of an acute pneumonia, non-tubercular. This latter case is reported below under vesical tuberculosis as case 2. Of the 6 cases that were untreated, 2 have had left nephrectomy, 1, one year after examination who died nine years later of generalized tuberculosis; the other one has been



lost from observation. Of the other 4 cases, one was heard from four years after examination and at that time (1919) his general condition was good, but he has not been heard from since. One case has been lost from observation and the other 2 cases are dead, 1 seven years and the other a "short time after" diagnosis, both of tuberculosis.

To summarize, group 1, therefore, of the 12 cases that were followed 6 are alive and 6 dead, 3 of which had had epididymectomy.

### *Group 2*

Cases in which the seminal vesicles showed evidence of involvement clinically, 17 cases, 5 of which were treated by epididymectomy and 12 were untreated surgically. Of the 17 cases, 8 have been lost track of and 6 of these 8 cases at the time of examination had marked pulmonary involvement. Six are alive, 2 in good condition and 4 with active tuberculosis. Three are dead. Five of the cases were treated by simple epididymectomy, bilateral in 4, right side only in 1 the 4 showing clinical evidence of bilateral involvement of seminal vesicles and the 1 clinical evidence of involvement of the right seminal vesicle only. Two of these cases are known to be in good condition, 1 four years and the other six years after operation; the former writes that he has an inflammatory nodule on his scrotum. Two cases have had poor results, one being followed for only 8 months and the other for 2 years. The latter case is particularly interesting as he has had the best type of sanatorium treatment during this two year period. He had a right nephrectomy for tuberculosis in 1925 and a right epididymectomy in 1926. At that time he had clinical evidence of involvement of the right seminal vesicle but the physician in charge advised against any radical surgery. He has been seen and the disease has spread to his opposite seminal vesicle and to the opposite epididymis. His disease in the lungs has become active and, in spite of rest and good sanatorium care with scientifically directed heliotherapy he has continued to lose ground. One case died six days after epididymectomy of embolism. He had had a left nephrectomy twenty-five days

previously and had clinical evidence of extensive involvement of both seminal vesicles, bladder and bronchial lymph glands. Of the 12 cases untreated surgically in which the seminal vesicles gave definite clinical evidence of involvement, 10 bilateral, 1 on the right side and 1 on the left side only, 4 had clinical evidence of bilateral tuberculous epididymitis, one right epididymitis and 3 left epididymitis only. In other words, there were 4 cases with clinical evidence of involvement of the seminal vesicles without evidence of involvement of the epididymes. Six had an associated urinary tuberculosis, 3 evidence of tuberculosis of both kidneys, 2 right kidney alone, 2 left kidney alone. Four of these had evidence of vesical involvement. One case had had right nephrectomy performed, and one a left orchidectomy. Eight of these cases have been lost from observation but of these eight 4 had such widespread tuberculosis that operation was out of the question and 2 others had extensive pulmonary tuberculosis. One writes six years after examination that he is still in fair health, 1 has a poor outlook on account of his generalized tuberculosis and is still in a sanatorium under treatment one and one-half years after examination. Two are known to be dead, 1 five weeks and the other two and one-half months after examination, both of tuberculosis.

To summarize group 2, of the 9 cases followed, 6 are alive and 3 are dead; 5 of the 9 had simple epididymectomy, 2 are improved, 2 are worse and 1 dead.

### *Group 3*

Cases of whole tract genital tuberculosis treated by radical bilateral epididymectomy, vasectomy, seminal vesiculectomy and in some cases partial prostatectomy, 13 cases. Of these 13, 2 have been lost from observation, 9 are known to be alive and 2 are dead. Of the 2 cases that have been lost track of, 1 was operated in 1919 and the other in 1920 at the age of forty-two and twenty-two respectively, the latter had had an eye enucleated for tuberculosis but otherwise neither had any associated involvement. This same case had right epididymectomy and right seminal vesiculectomy with removal of a considerable portion of the right

lateral lobe of his prostate but the left side of his genital tract was left intact. Of the two cases that are dead, 1 died three weeks after operation and was in very poor condition at the time of the operation, having extensive involvement of his whole genital tract with a big tuberculous abscess of his prostate and active lesions in his lungs and larynx, a case decidedly unsuited for radical surgery. The other case was a clinic case at the San Francisco Hospital who had had his testicles drained in 1918, some sort of a prostotomy or prostatectomy and right epididymectomy in 1919, a right nephrectomy in 1920 and a left epididymectomy and bilateral seminal vesiculectomy in 1922. He died 1 year later of generalized tuberculosis at the San Francisco Hospital, having had four separate surgical attacks on his genital tuberculosis, the latter of which alone had been performed by us. Nine of the cases are known to be alive and all in good condition, 1 eight years, 1 six years, 1 five years, 2 two and one-half years, 1 two years, 1 one and one-half years, 1 eight months and 1 three weeks after operation who is still in the hospital. These 9 cases may be well considered more in detail.

Case 1 (J. B., no. 5307). Living eight years after operation in 1919, was twenty-three years old, had extensive bilateral tuberculosis of the whole genital tract except for testicles and prostate, there was no bladder involvement, no kidney involvement, no clinical evidence of tuberculosis elsewhere. He had a slight perineal sinus periodically draining for three years. Since the closure of this he has had no urinary symptoms of any kind and his general health has been very good. He was last heard from in November, 1927.

Case 2 (J. M., no. 15546), is of considerable interest. He was last seen in the office and examined in November, 1927, and his only complaint at the time was partial impotency which bothered him because of his desire to get married. He had no urinary symptoms and his general health was excellent. His tubercular history is as follows: He had his left kidney removed in 1918 for tuberculosis and in the same year a left orchidectomy. In 1919 he had a right epididymectomy and, because of a discharging sinus in the groin, a left vasectomy in 1921. When first seen by us in 1922 he was twenty-nine years old, had clinical evidence of



tuberculosis of his right epididymis, the right vas, the right seminal vesicle and nodules in his prostate. He had active tuberculous lesions of his bladder and a bilateral seminal vesiculectomy and partial prostatectomy was performed. For several months following he had an intermittent perineal fistula which has been completely closed for the last four years, and as stated above his general condition now is excellent (November, 1927).

Case 3 (C. B., No. 16558), known to be living five years after operation, had a radical bilateral epididymectomy, vasectomy and seminal vesiculectomy performed in 1918. He was last seen and examined in the office in 1924. He had no urinary symptoms, negative renal findings, no perineal fistula and his general condition was excellent. At the time of operation he had no associated tuberculosis, no renal tuberculosis, no bladder involvement and at the time of operation there was no involvement of his prostate found.

Case 4 (C. B., no. 29764), known to be alive and well two and one-half years after operation, had radical bilateral epididymectomy, vasectomy and seminal vesiculectomy with partial prostatectomy performed in 1925 at the age of thirty-five. He has been under observation off and on since, his general condition has been good and he is without urinary symptoms or evidence of tuberculosis anywhere. He was last seen and examined in the office in February, 1928.

Case 5 (E. F., no. 11518), known to be living two and one-half years after radical operation, had had left epididymectomy performed in 1921, in 1925 he had right epididymectomy, right and left vasectomy and bilateral seminal vesiculectomy. There was no clinical evidence of tuberculosis elsewhere and when seen two and one-half years afterwards he had no urinary symptoms, no sinus and no evidence of tuberculosis elsewhere and his general condition was excellent. He was last seen and examined in November, 1927.

Case 6 (A. C., no. 29228), known to be living and well two years after radical operation, had clinical evidence of bilateral seminal vesiculitis and right epididymitis. In 1925 at the age of thirty-one he had a right epididymectomy and right vasectomy with bilateral seminal vesiculectomy and partial prostatectomy performed. At the time of this operation the left ureter evidently had been injured because following it he had



persistent urinary fistula in the perineum. Six months after operation urological study revealed evidence of tuberculosis of the left kidney and



FIG. 1. PHOTOGRAPH OF SPECIMENS REMOVED IN CASE 7 (E. D., No. 39277)

The vas was divided near the epididymis on each side and has been brought into apposition for the picture. A portion of the prostate has been removed on the right side. Blocks from different portions of the vesicles, epididymi have been examined microscopically and show active tuberculosis.

left nephrectomy was performed, the kidney removed showing active early tubercular lesion in one pole. There was no bladder involvement.

Following his nephrectomy he has been free of urinary symptoms and his general health has been excellent. The fistula promptly closed. When last heard of he complained of a slight intermittent discharge in the perineum but has refused examination or treatment of this sinus.

Case 7 (E. D., no. 39277), living one and one half years after radical operation, had a left nephrectomy performed by us three months previously and in 1927 at the age of twenty-five had active bilateral tuberculous epididymitis and vesiculitis with some slight vesical ulceration, acid fast organisms being found in the bladder urine. There was no evidence of tuberculosis of the remaining right kidney. Radical bilateral epididymectomy and vasectomy and seminal vesiculectomy with partial prostatectomy were performed. Photograph of the specimen removed is reproduced in figure 1. He was seen in the office and re-examined in 1928, one and one-half years later, and still has a small discharging sinus in the perineum without any urinary leaking. His general condition is good.

Case 8 (L. B., no. 38584) was operated in 1927 at the age of twenty-seven and also had had a right nephrectomy performed three months previously. He had extensive active tuberculous epididymitis, vesiculitis and prostatitis and at operation bilateral epididymectomy, vasectomy, seminal vesiculectomy and partial prostatectomy were performed. He was last seen and examined in the office on February 9, 1928, eight months after this radical operation. His general condition was very good, the urine was clear, no urinary symptoms, but he still had intermittent perineal sinus without urinary leaking.

The last case (E. O., no. 34616) is still in the hospital. In 1925 he had a right nephrectomy for tuberculosis, in 1926 he had a left epididymectomy and a partial left vasectomy, this year he had active tubercular lesions of the bladder with such marked hemorrhage as to require cystotomy and active coagulation with diathermy of the bleeding ulcer. He is a young man, now twenty-six years of age, who has refused all advice as to the proper care of himself, keeping continuously at work. Recently there was a quite active flare-up in his seminal vesicles and remaining epididymis and on May 12, 1928, he had right epididymectomy and vasectomy and bilateral seminal vesiculectomy performed. He is still in the hospital and his post-operative condition is in every way satisfactory. There is no clinical evidence of active tuberculosis elsewhere.

To summarize the results of radical surgery for genital tuberculosis, 2 are dead, and both of these were poor surgical cases, 2 have been lost, and 9 are living and well. The result in these 9 cases has been in every way satisfactory except for the perineal sinus which has persisted months to a few years in those cases which have had partial prostatectomy. It is possible that in these cases with persistent sinus the disease has not been completely removed from the prostate by the operation. The sinus has in no way incapacitated any of the patients, merely necessitating the wearing of a small pad periodically. In most cases there is no urinary discharge through the sinus and it closes and opens periodically, discharging a small amount of seropurulent material. In those 5 cases in whom the operation was performed two and one-half years or more ago the fistula has permanently closed in all.

It is of course impossible to make any rigid comparison in the results of the above three groups of cases. Results in those cases that have been treated radically are so much superior to the results of those treated by simple epididymectomy or untreated that this might be used as an argument strongly in favor of the radical operation. On the other hand, these 13 cases that have had radical operations with two exceptions had no clinical evidence of tuberculosis elsewhere. One of these cases was unsuited for operation because of active lesions in the lungs and larynx and died three weeks after operation. From the results in the other 12 we believe that the radical operation is the logical treatment for cases showing similar conditions and therefore that the radical operation was indicated in a few of those cases grouped under clinical seminal vesiculitis but untreated, inasmuch as in none of these cases that had extensive active seminal vesiculitis has the improvement been anything near as marked or satisfactory as in this other group of cases in which these lesions were radically removed surgically. We are unprepared to advise seminal vesiculectomy in that group of cases with clinical evidence of tuberculous epididymitis alone. Many of these cases may show evidence of active tuberculosis of the seminal vesicles later and, provided there is no active tuberculosis elsewhere, seminal



vesiculectomy can be then performed. Our experience leads to the conclusion that all cases of urinary and genital tuberculosis should be kept under observation for many years after the initial diagnosis and treatment.

The clinical recognition of genital tuberculosis is not always an easy matter. Many subacute or chronic cases of non-tuberculous infection are difficult of differentiation. Nodulation is a prominent characteristic of the lesion but some non-tuberculous lesions are also nodular. Because of this difficulty we have made it a rule to perform epididymectomy first and have an immediate pathological examination made before proceeding to remove the vesicles. We have had two cases in which tentative diagnosis of tuberculous epididymitis failed of confirmation upon microscopic examination. There was slow onset, no pain, nodulation, abscess, sinus formation, but negative findings per rectum and after bilateral epididymectomy the pathologist reports "chronic inflammation, no evidence of tuberculosis." Our 13 cases of radical removal have all been confirmed.

#### VESICAL TUBERCULOSIS

Tuberculous ulceration of the bladder is common in both renal and genital tuberculosis. Of our 148 cases of genito-urinary tuberculosis, 110 had cystoscopic evidence of active tuberculosis of the bladder. The lives of many of these cases are rendered miserable because of this lesion. After removal of the primary focus in the genito-urinary tract these bladder lesions often heal spontaneously. The care of tuberculosis in general, rest, food, sunlight, heliotherapy, etc. is beneficial and where there is definite localized ulceration, light fulguration through the cystoscope will often stop the spread of the lesion in the bladder and bring about healing. In many cases, however, the bladder wall becomes diffusely involved, the bladder markedly contracted and because of this contraction and inflammation of its wall the ureteral orifice of the remaining healthy side becomes markedly constricted and obstructed. We have had a number of cases of this kind in which there was evidence of a progressive back pressure destruction of a remaining non-tuberculous kidney on account of



this advanced tuberculosis of the bladder. Bladder drainage by cystotomy does not relieve this obstruction.

The first case of this kind (M. R., no. 29390) seen in 1920 was a woman aged thirty-three with the following previous history of tuberculosis: in 1916, four years ago, the patient consulted a physician elsewhere for frequency and pyuria. A diagnosis of tuberculosis of the right kidney was made and a nephrectomy done. There was some temporary improvement in her bladder symptoms but they had become much worse again during the past six months. On examination at this time she had marked pain, frequency and burning on urination with left sided back ache. She was treated for over a year by the usual methods of bladder irrigation, fulguration, etc., without benefit and in February, 1921, her bladder had shrunk to a capacity of only about 30 cc. Cystogram showed a dilated ureter and hydronephrosis of the remaining kidney. Because of inability to give relief by bladder treatments, transplantation of her left ureter into the lower sigmoid was considered indicated not only in order to give relief but to stop the progressive hydronephrotic atrophy. This transplantation was done on February 15, 1921, but a ureteral tube was not left in place and the ureter failed to drain so that a secondary operation was required on the third day post-operative. Her post-operative course was practically uneventful and she was discharged on March 23. In May she reported she had gained 15 pounds in weight, feels better and is much stronger, has no bladder symptoms of any kind and passes urine per rectum 4 to 5 times in the morning and once or twice in the afternoon and is usually up once or twice at night. A year later she writes that she is feeling well, has gained still more in weight, her present weight being 121, as compared to 95 pounds on admission to the hospital. She was not seen again until 1925, four and one-half years after the ureteral transplantation, when she came in unable to void, semi-irrational with a blood pressure of 155/60 and a blood urea of 147 mgm. per 100 cc. Plain x-ray picture showed a large shadow in the region of the upper left ureter and a left ureterolithotomy was immediately performed. The kidney failed to recover secretory activity and she died of uremia one day later.

Case 2 (A. R., no. 18008), man forty-four years old with a similar advanced tuberculosis of his bladder who had had a left nephrectomy in 1919 followed within three months by recurrent attacks of hematuria and marked frequency until at the present time he has practically incon-

tinence. It was impossible to catheterize his right ureter and prolonged treatment for the next one and one-half years failed to give any improvement in his active tuberculosis of the bladder. On January 8, 1923, he had a phthalein output first hour of 11 per cent, second hour 19 per cent, and this had been about the amount of renal function as evidenced on many previous tests, it being as low sometimes as a total of 10 per cent. On January 10, 1923, he had a right ureterorectoneostomy, a markedly thickened hydroureter being implanted into the large bowel. He came



FIG. 2. REPRODUCTION OF URETEROPYELOGRAM MADE AFTER CATHETERIZING THE URETER THROUGH THE RECTUM WITH THE CYSTOSCOPE IN CASE 3 OF URETERORECTONEOSTOMY. (J. S., No. 33378)

back six months later for observation and phthalein test per rectum showed 13 per cent first hour and 8 per cent the second. He voided per rectum every two to four hours but slept from 9 p.m. to 5 a.m. at night without getting up. He had no further bladder discomfort or pain. On February 7, 1924, this patient developed a very acute pneumonia and died the next day at the Central Emergency Hospital. An autopsy was performed at the coroner's office which showed a right sided lobar pneumonia but we were unable to get the kidney and ureteral transplant.

The third case (J. S., no. 33378) was a man aged thirty-five with a history in every way similar to the above two who had had a right nephrectomy in February, 1920, and for the next four or five years had suffered intermittently with vesical tuberculosis. He was admitted December 8, 1925, with marked vesical hematuria due to ulcers of the bladder and these were fulgurated on several subsequent admissions without improvement. On February 23, 1926, bladder capacity was



FIG. 3. REPRODUCTION OF THE X-RAY FINDINGS IN A CASE WHICH HAD HAD NEPHROSTOMY PERFORMED PREPARATORY TO URETERAL TRANSPLANTATION

The hypertrophied, dilated and angular ureter is well outlined. Autopsy examination of this case, however, showed that there was active tuberculosis in the hydronephrotic kidney as well as tuberculosis of the ureter.

only 25 cc. and he had incontinence. On January 8th on account of inability to heal the bladder tuberculosis, the distress of the patient and the failing renal function, a left nephrostomy was\*performed. The renal function per urethral catheter on December 28th was first hour 15 per cent, second hour 20 per cent. Through the nephrostomy tube on February 23 the phthalein output was first hour 29 per cent, second hour 28 per cent. On February 25, 1926, a ureterorectoneostomy was performed, the left hydroureter being implanted into the rectum. The



phthalein per rectum on March 18 was first hour 24 per cent, second hour 28 per cent. On April 9 a pyelogram was taken by inserting a catheter into the opening in the rectum cystoscopically and is reproduced in figure 2. The patient was discharged on April 26 with the nephrostomy wound entirely healed. His improvement has been quite marked and continuous, he has no bladder symptoms, has gained in weight and he is actively at work now more than two years since operation. (He was last seen in April, 1928.)

The fourth case (C. C., "SFH") was a man aged thirty-eight admitted to the San Francisco Hospital who had had a right nephrectomy and left epididymectomy performed in 1925, following which there had been a pronounced tuberculosis of his bladder, treatment of which gave no benefit. The patient is in poor general condition with a history of a previous active tuberculosis of his lung and pleurisy with effusion which had been tapped several times. On November 6, 1925, a left nephrostomy was performed and one month later a ureterorectoneostomy. The patient died twenty-three days after operation and at autopsy generalized miliary tuberculosis of the lungs, liver, spleen, kidney and omentum was found.

Figure 3 shows a similar pathological condition in a fifth case (J. B., "SFH"), in whom a nephrostomy had been performed preparatory to hydroureterorectoneostomy. The patient's improvement following nephrostomy was quite remarkable but he developed suicidal mania and killed himself by jumping out of a window of the hospital.

#### CONCLUSIONS

Genital tuberculosis occurs with renal tuberculosis, with tuberculosis elsewhere, as lungs, bones, glands, etc., and as a primary lesion unassociated with active tuberculosis elsewhere.

Nephrectomy should have priority in treatment in unilateral renal involvement associated with active genital lesions even in the presence of tuberculosis elsewhere.

There are two clinical types of genital tuberculosis: (I) the more advanced or only lesion is in the epididymis; (II) the seminal vesicles are involved with or without epididymitis. When unassociated with active lesions elsewhere the indication is epididymectomy for type I and the radical operation for type II.



With active lesions elsewhere consideration of their activity and extent relative to the activity and extent of genital involvement must influence judgment as to the advisability and type of surgery, if any.

After whatever surgery or treatment all cases should be kept under control and observation for a long time.

Vesical tuberculosis may remain the only active lesion in some of the above cases after surgery, and may be so advanced as to render life miserable because of pain, frequency and incontinence. The ureteral orifice becomes constricted by the tuberculous process and progressive hydronephrosis and renal insufficiency follow. Where there is no active tuberculosis elsewhere, temporary nephrostomy with permanent ureterorectoneostomy may give relief and prolong life.

## OBSTRUCTIVE HYDRO-URETERAL ANGULARITY WITH HYDRONEPHROSIS IN CHILDREN

### SURGICAL TREATMENT \*

FRANK HINMAN, M.D.

SAN FRANCISCO

The general policy of making a complete urologic examination of children suffering with chronic pyuria has brought to light an interesting and as yet poorly classified group of pathologic conditions. In the majority of instances, an obstruction at some portion of the primary tract

#### *The Direct Pathologic Effects of Obstruction*

I. Local Changes (Obstruction)		II. General (Infection)	III. Functional
In the urethra	Extravasation of urine	Urinary sepsis, whether ascending or descending, localized or progressive	Disturbances of urination: frequency, burning, dribbling, incontinence, retention
	Abscesses		
	Urinary fistulas	Urethritis	Renal insufficiency
In the bladder	Trabeculation	Cystitis	
	Cellule formation		
	Diverticulum		
	Hypertrophy of inter-ureteral ridge		
	Dilatation		
	Rupture		
In the ureter	Hydro-ureter	Ureteritis	Uremia
	Ureteral hypertrophy and angularity		
	Ureteral diverticulum		
In the kidney	Hydronephrotic atrophy	Pyelitis Pyelonephrosis Infected hydronephrosis Pyonephrosis	
	Secondary atrophy		

has been the primary factor in the chronicity of the pyuria. The obstructive syndrome is probably the same in children as in adults. Although pain is not so prominent, the sequence of changes of obstruction-pain-infection obtains, and these effects are due to various causes of back pressure, stasis or back-flow, just as in adults. Infection is always imminent in the presence of any of these, and the clinical effects in their relation to the pathologic changes are diagrammatically represented in the foregoing outline.

The nature of the causes that are known to produce these local, general and functional effects is complex and often difficult of recognition. They are generally grouped as congenital or acquired in nature, and it is a common practice to speak of the pathologic effects of back-

\* Read before the Section on Urology at the Seventy-Ninth Annual Session of the American Medical Association, Minneapolis, June 14, 1928.

pressure as congenital when, strictly speaking, the cause only is congenital. The effects, such as diverticulum, hypertrophy of the interureteral ridge, hydro-ureter and hydronephrosis, are acquired. Naturally, the congenital causes would be expected to be more frequent in the obstructive conditions of childhood than the acquired ones and, although the discussion of causes is not my object in this communication, they are listed herewith in order to emphasise this point of departure and to define more clearly the condition of obstructive ureteral hypertrophy and regularity.

*Causes of Obstruction*

A. CONGENITAL CAUSES

I. Of the Lower Tract:

- Long tight foreskin
- Congenital stricture of the urethral meatus
- Posterior urethral valves in boys (hypertrophied verumontanum)
- Urethrocele or diverticulum
- Abnormal opening and fistulas (hypospadias, epispadias, exstrophy)
- Contracture of the vesical neck

II. Of the Upper Tract:

1. Urethral Anomalies:

(a) Of Form:

- (1) Valves or folds (usually associated with other conditions and therefore difficult to say whether or not they are all acquired or secondary causes of obstruction)
- (2) Megalo-ureter (congenital defect of innervation or of muscle development—persistence of fetal type ureter into infancy)

(b) Of Division:

- (1) Double or triple
- (2) Diverticulum

(c) Of Termination:

- (1) In the bladder wall, producing kink,  
valve,  
pouch or diverticulum,  
ureterovesical cyst
- (2) Abnormal or blind openings—in urethra, intestines or accessory sex ducts; (male) seminal vesicles, ejaculatory ducts, etc.; (female) vagina, uterus, etc.

2. Pyelorenal anomalies:

- (a) Of form and number (double pelvis, horse-shoe kidney or solitary lump kidney)
- (b) Of size
- (c) Of position (incomplete ascent)
- (d) Of vascularization (aberrant vessels or bands, producing kink or valve, the commonest cause of so-called congenital or idiopathic hydronephrosis)

(See II-1-b 4 in section B of this table)

## B. ACQUIRED CAUSES

### I. Of the Lower Tract

#### 1. Urethral:

Phimosis  
Stricture  
Stone  
Tumor  
Diverticulum

#### 2. Urethrovesical:

Prostatism (such as hyperplasia, cancer, median bar and contraction of the vesical neck)  
Prostatic cysts  
Urethrovesicle polyps

#### 3. Vesical:

Tumor  
Stone  
Diverticulum  
Hypertrophy of the interureteral ridge  
(The last two usually secondary)

### II. Of the Upper Tract

#### 1. Ureteral:

##### a. Local:

Stone and foreign bodies

##### b. General:

- (1) Stricture and stenosis (1, focal [Hunner] or 2, local [as in pelvic inflammatory, vesiculitis], 3, traumatic)
- (2) Kinks or angularity (from bands, blood vessels, inflammatory or postoperative adhesions)
- (3) Pressure from outside (pregnancy, pelvic tumors, etc.)
- (4) Ureteropelvic conditions with ptosis (valve, kink, fold, stricture, ureter is fixed and does not follow movements of kidney)  
(Closely related to anomalies of vascularization, A-II-2-d)
- (5) Ureterovesical conditions (stricture of intramural inflammation)
- (6) Diverticulum (secondary)
- (7) Ureteral hypertrophy and angularity (secondary)

#### 2. Pelvic (ureteropelvic):

Stone  
Tumor  
Parasites

#### 3. Renal (ureteropelvic):

Stone  
Tumor  
Ptosis with kink or angulation, related to 1-b-4  
(From aberrant bands, adhesions or blood vessels)

### III. Dilatations without evidence of obstruction

(Functional disturbances, adynamic conditions such as might be the result of nerve disturbance. Tabes, paresis, etc.)



If one were to indicate in the list shown in the table the most frequent congenital causes of obstruction, abnormalities of the posterior urethra and the bladder neck in the lower tract and the anomalies of division and of termination of the ureter and the anomalies of vascularization of the upper tract would probably be selected. Analysis of the acquired causes is a much more difficult matter. In men prostatism is common, but changes in the lower tract dominate the clinical picture. Acquired conditions of the upper tract in men, women and children form a confused, unclassified group about which few urologists agree. The relative importance and significance of ureteral stricture, ureteral kinks and renal mobility are undetermined and will probably remain so until methods of study and interpretation have become standardized. But it is not my purpose to enter this controversy here, and I have outlined it in order to present more clearly a certain type of obstruction that follows various of the foregoing conditions, both congenital and acquired, mechanical and dynamic or primary and secondary.

This special condition is best defined by the term obstructive hydro-ureteral angularity. It is frequently encountered in children, and seems to me to be secondary and not primary. It is often difficult and sometimes impossible definitely to determine a primary cause of obstruction when marked back-pressure changes have occurred, even in adults it has long been recognized that certain of these back-pressure changes can of themselves produce obstruction. Diverticulum of the bladder and hypertrophies of the interureteral ridge, although secondary to an obstructive condition, can so develop as to produce of themselves marked obstruction to the urinary outflow. In my opinion, the following group of cases illustrates a similar condition of secondary obstruction but one that occurs in the upper urinary tract, even though it has been impossible to determine definitely the primary obstructive condition in a few of the cases.

If my assumption is correct, the condition of posterior urethral valves in boys would be ideal for the production of obstructive hydro-ureteral angularity. Relief of the urethral obstruction would not be of permanent benefit in those patients who have developed this secondary ureteral condition. With this point in mind, I have recently analyzed my cases.

#### ANALYSIS OF CASES

Of the twelve patients seen to date with posterior urethral valves, four are dead of uremia and two have disappeared from observation. In the six known to be alive the urethral valves were destroyed—in one, by cystotomy; in five, by fulguration per urethram; in one, six years; in one, four years; in one, three years; in two, two years, and in one, one year before this paper was written. Of the patients who were

not followed, one was treated by fulguration five years and the other two and a half years before the present admission. The condition of the upper urinary tract in these two patients was not studied at the time of the first admission, and they failed to return for investigation. Urethral valves, however, were definite and every effort is being made to get these patients back for further study. The four patients who died all had huge bilateral hydro-ureters and hydronephroses and died of urinary sepsis and uremia. One,<sup>1</sup> aged 18, was uremic on admission and died in the hospital under treatment with a retention catheter. One,<sup>2</sup> aged 6½, "never regained his health after leaving the hospital in 1917" (valves destroyed), though "he went through grammar school and was in his sophomore class in High School when we lost him on March 24, 1927," according to a note signed by the father. He was 16 when he died. The third, aged 21, died twenty-seven days after perineal resection of the valves which was performed after thirty-five days of catheter preparation during which time renal function had improved from no dye excreted in two hours to an output of 21 per cent. The nonprotein nitrogen climbed to 230.7 mg. per hundred cubic centimeters a few days before death. The fourth patient, aged 21 months, died a few days after unilateral nephrostomy. The urinary tract, which was removed intact after death, illustrates the condition I am attempting to describe of bilateral obstructive hydro-ureteral angularity (fig. 1). The upper right tract has shrunk considerably following the relief of back-pressure by nephrostomy, but the elongation and tortuosity of both ureters are remarkable, and only a thin shell of renal tissue remains in each hydronephrotic sac.

Four of the remaining six patients who are alive show bilateral obstructive hydro-ureteral angularity of varying degree. Three of these cases are reported later in the paper in connection with surgical treatment (cases 4, 5 and 6). In two of the six the changes in the upper tract do not seem to have advanced to a degree sufficient to produce secondary urinary obstruction, but complete studies were not made in either. One patient was only 2 years old on admission, Jan. 14, 1926, and had a total phthalein output on January 16 of: first hour, in 60 cc. of urine, a trace; second hour, in 100 cc., 21 per cent; total, 21 per cent. Three obstructing folds of mucous membrane in the posterior urethra were destroyed by fulguration. One year later the phthalein output was more than 50 per cent in two hours, and the child, now aged 3 years, was clinically well and the urine normal. But, in view of subsequent experience, I believe that this child should be reexamined.

---

1. Case 6 in Hinman, Frank: Congenital Valvular Obstruction of the Posterior Urethra, *J. Urol.* **14**:71 and 83, 1925.

2. Case 1 in Hinman (footnote 1).

The other boy is 11 years old and was seen only three months before this paper was written. The valves have been destroyed but the enuresis, which led to their discovery, still persists and the boy is returning soon for further investigation. The condition of the upper tract in the other case, which is believed to be one of bilateral obstructive hydro-ureteral angularity, is shown in figures 2 and 3. This boy was 4 years old in



Fig. 1.—Kidneys, ureters and bladder with the posterior urethra removed en masse at autopsy. The right side was shrunk on account of nephrostomy drainage. The left ureter is from 2.5 to 3 cm. in diameter in places.

June, 1922, when these pictures were made. The valves were destroyed by fulguration, July 11, 1922. His mother wrote, in February, 1928, that "he is growing fast, is somewhat above normal weight, general health is very good" but "a very little albumin and a few pus cells in the urine" were reported by the local physician who was giving him "hexylresorcinol, one capsule three times a day after meals." On

Dec. 27, 1923, this boy came back for observation. There were from 8 to 10 pus cells in a high dry field, but the total phthalein output was low, only a faint trace being returned in fifty minutes and after four hours only 10 per cent. Residual urine was not found but reexamination of the upper tract showed an enormous left hydro-ureter and hydro-nephrosis. The right was not shown in the cystogram. If the results of the surgical treatment in the other three cases reported below are at all successful, this boy should be operated on also as he cannot survive long under the present conditions. He has bilateral obstructive hydro-ureteral angularity.

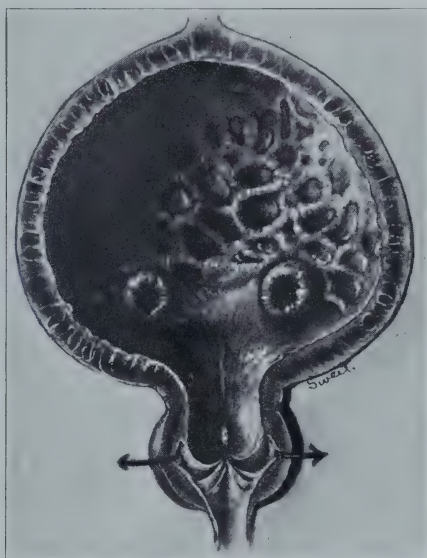


Fig. 2.—Posterior urethral valves in a boy, aged 4 years. This case was described by Hinman, Frank: Congenital Valvular Obstruction of the Posterior Urethra, *J. Urol.* **14**:76, 1925.

So far, the assumption that hydro-ureteral angularity is secondary may withstand criticism because all of the foregoing cases show a definite primary obstruction of the lower urinary tract. However, similar and bilateral conditions have been observed in girls, in some of whom it has been impossible definitely to locate an obstruction of the lower tract.

A girl, aged 3 years, was admitted to the hospital in October, 1926, complaining of periodic attacks of fever and pronounced pyuria, but no urinary symptoms. Plain roentgenograms were negative, and the total phenolsulphonphthalein output was 43 per cent for the first hour and 10 per cent for the second hour. The two ureteropyelograms illustrated in figures 4 and 5 show a condition of hypertrophied



tortuous ureters similar to that described in boys. Attempts to get this patient back so as to find out what condition exists at the present time have failed. The cystoscopic study did not show an obstructive condition at the bladder neck or in the urethra. One may have been present in the lower ureters.

The condition in another infant, referred by Dr. Lucas, is both interesting and suggestive in this connection. This patient, a girl, was 15 months old and had been suffering for about six weeks with periodic attacks of vomiting associated with high fever. For the last three months the mother had noticed that the urine



Fig. 3.—Ureterogram obtained on left side in the boy referred to in figure 2.

had a strong odor, and examination of the urine by Dr. Lucas revealed a pronounced pyuria. Urologic study showed a rather dilated bladder with a capacity of about 500 cc. The ureteral orifices appeared dilated, the one on the right in particular being the shape of a golf-hole. The left seemed to be somewhat redundant with a mucous flap, although there was no obstruction to the passage of catheters, and ureteropyelography on subsequent days showed somewhat dilated ureters and a mild degree of hydronephrosis on both sides. These kidneys were washed twice. The infant was last seen on March 8, 1927, when a no. 10 bulb was easily passed to the pelvis of each kidney. Obstruction of the lower tract was not found.

It will be an interesting study to see whether in this case the ureteral and pelvic changes will be progressive. When this child reaches the age of 5 to 11, will the condition of the upper urinary tract be the same as in most of the other cases? It is, of course, possible that the ureteral dilatation will have relieved somewhat the obstructions present but, as there was no particular difficulty in passing the bulbs, this is unlikely.

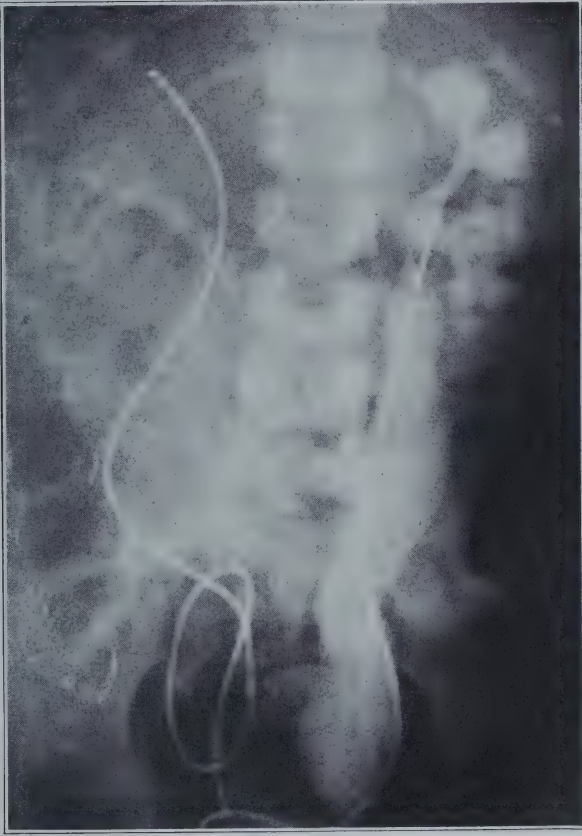


Fig. 4.—Ureterogram of girl, aged 3 years, showing a markedly dilated, angular ureter without as yet much hydronephrotic atrophy, a condition more nearly analogous to what is usually referred to as megalo-ureter. The condition of the opposite kidney is illustrated in figure 5.

The defect would seem to be from above downward rather than from below upward.

That the condition may be unilateral but acquired and not congenital would seem to be shown by the condition found in a girl, aged 11 years, referred because of a long standing pyuria and recurrent attacks of fever and pain in the right side. She had been advised, and probably

rightly so, in another city where urologic study had been made, to have a right nephrectomy performed. Through a no. 21 F cystoscope a large, balloon-like mass about 7 cm. in diameter projecting from the right ureteral orifice was seen. The surface of this ureterocele, or ureterovesical cyst, was easily indented by the tip of the catheter, but the ureteral orifice was not seen or found by probing. On overdistention of the bladder, however, the cyst collapsed completely and dis-



Fig. 5.—Ureteropyelogram on the left side of the kidneys of the patient in figure 4.

closed a large, dilated orifice; when attempts were made to catheterize this the catheter would coil up in the cavity. The wall of the cyst was destroyed by fulguration, and then the catheter could easily be passed up the right ureter. The ureteropyelogram then taken is reproduced in figure 6 and shows marked angularity and dilatation in both the upper and the lower thirds of the ureter, in every way similar to the ureteral changes following partial obstruction in the posterior urethra already described. The patient was advised that a left ureteropyelogram should be taken and that, if this side was normal, she should wait a short



time to see if removal of the lower ureteral obstruction caused repair of the hydronephrosis. If not, the degree of improvement in function with a retained ureteral catheter should be tested as an indication of whether nephrectomy should be performed or an attempt made to repair the hypertrophied, dilated and angular ureter. If the left kidney is found to be abnormal, conservation would be even more indicated. In spite of

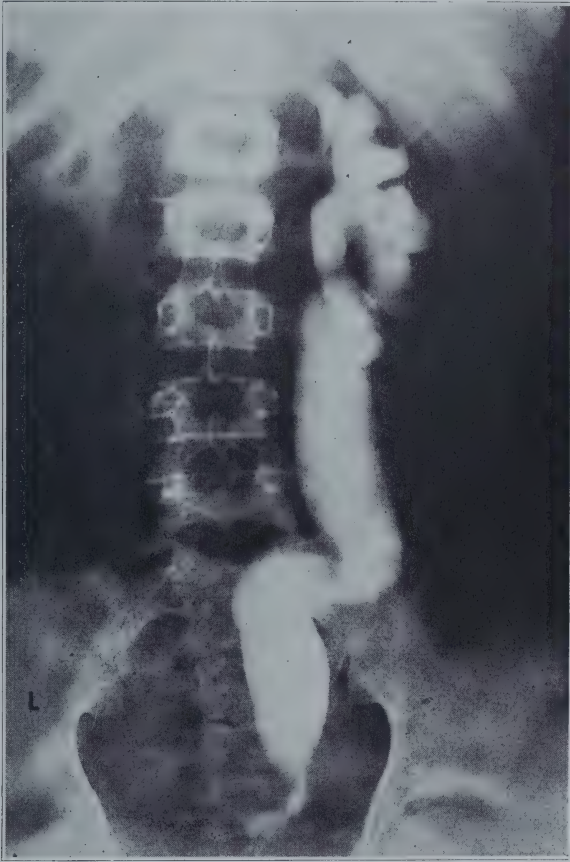


Fig. 6.—Hydro-ureteral angularity resulting from obstruction due to ureterovesical cyst.

the low function, as evidenced by absence of phenolsulphonphthalein on the right side at the time of the first ureteral catheterization, experience has shown that a most remarkable improvement in function follows good drainage even when the remnant of renal tissue is small. The advisability of conservative surgery would be well shown by the degree of improvement in function following the use of a retention catheter for a few days. This patient returned home, several thousand miles



away, had another attack of fever and pain and a right nephrectomy was performed. This, no doubt, was the simplest and safest procedure in view of the probabilities that the remaining kidney is normal, but the possibilities of conservation and repair of such kidneys in children should not be overlooked.

#### DEFINITION AND DIAGNOSIS

Obstructive hydro-ureteral angularity is an acquired condition that follows a partial obstruction, the cause of which may be congenital or acquired and is always accompanied by hydronephrosis. It is secondary to the primary obstruction just as much as the hydronephrosis is secondary. Hydronephrotic atrophy is the pathologic effect of obstruction on the pyelorenal structures, hydro-ureteral angularity, the pathologic effect of the obstruction on the ureter. The primary obstruction producing it is always in the lower tract or the lower ureter. It is to be at once distinguished from cases of congenital or other types of atony of the ureter in which there is marked relaxation and dilatation but without hypertrophy of the wall, tortuosity or pronounced elongation, a type of case which has been recognized clinically as megalo-ureter or ureteral atony. The condition also is to be differentiated from cases of hydronephrosis in which the obstruction is definitely in the upper ureter or at the ureteropelvic juncture, the common cause of which is an aberrant blood vessel. The condition is also to be distinguished from the common type of hydro-ureter seen in adults of which there is no marked angularity, although adults can develop an obstructive hypertrophy and angularity. The distinction lies in the twists and corkscrew deformities that have developed as a result of peristaltic overactivity. A certain prolonged but mild type of obstruction seems required. The ureteral wall hypertrophies and elongates as well as dilates, and the angularity produced forms kinks and bends that become bound together by adhesions and collateral blood vessels. Because of the fixation of the angularity, urinary obstruction results. The angularity is most marked at the lower and upper portions but, as well shown in the specimen of the advanced case illustrated in figure 1, may involve the whole ureter. When the condition exists, removal of the primary obstruction will not give permanent relief of the progressive hydronephrosis.

The condition is diagnosed by cystography and ureteropyelography. Cystography is usually successful in demonstrating the changes in the upper tract in all cases showing obstructions of the lower tract. Ureteral catheterization of the angular, corkscrew hydro-ureters is often impossible, the catheter coiling up in a dilatation below some lower angle, but even from here the dilated ureter can frequently be filled for

ureterography. The coiled position of the catheter as seen in the roentgenogram is a good indication of the ureteral condition even when the pelvis cannot be reached. But the very nature of the condition precludes the possibility of an obstruction from below once the primary factor of obstruction is passed, so that I have never failed, on the second trial, at least, to outline the ureter and pelvis even with the catheter coiled in the lowest sacculatation.

#### COMMENT

The confusing feature in the classification of this condition as secondary to some other obstructive condition is its occurrence in girls in whom obstructions of the lower tract cannot be found. In a few cases there is slight evidence of some hypertrophy of the bladder muscle, indicating that there might have been some mild obstruction of the lower tract. Pyuria, frequency, enuresis or dribbling are commonly found in the history, but it is hard to conceive how chronic irritation causing increased frequency brings about such marked changes in the upper tract. It is more probable that the condition has some definite relationship to ureteral development and growth as it is most marked in the very young, although one finds similar back-pressure changes in adults. Back-pressure ureteral changes from acquired obstruction, as seen in adults, do not as a rule show the same degree of redundancy and angularity that develops in the young. The explanation of the condition as secondary to obstruction is plausible when it is found in association with those cases which present posterior urethral valves, and with other cases showing definite obstructive conditions at the ureterovesical juncture. It is possible that some of these hypertrophied hydro-ureters with angularity found in girls without definite obstructions of the lower tract were partially obstructed because of the abnormal manner in which the ureter opened into the bladder, or the abnormality may have started with a temporary obstruction due to a uric acid calculus. Beer has emphasized the frequency of this condition in childhood. An analogous condition is often observed in experimental animals whenever a partial obstruction of the lower ureter has been produced. I recall an experiment in which a rubber band had been so placed about the lower ureter as partially to obstruct it. But one year later, when the ureter was explored with the dog anesthetized, it was seen to be undergoing marked peristalsis and had so elongated itself as to be kinked and angular just as the hydro-ureters of the children whose cases have been reported previously. These tortuous angularities, however, had not been bound together with the firm adhesions and collateral blood supply as in the foregoing clinical cases, and retransplantation to the bladder effected repair of the hydronephrosis.

A retention ureteral catheter, when it can be properly placed, is the most valuable method of determining the advisability of subjecting these patients to operation. Improvement in renal function on retained ureteral catheterization gives reliable indication of the improvement that may be expected when the urinary outlet is made free surgically.

It must be kept in mind in connection with consideration of treatment that renal repair in children is a different and much more hopeful problem than in adults. Pathologists have shown that new formation of glomerular and tubular units continues after birth up to the seventh to the tenth years. Probably even with proper stimulation there would not be a greater number of glomerulotubular units formed than occurs normally, but some recent experimental work on compensatory hypertrophy in rats shows clearly that the rate of development of these new, forming secretory units and the degree of hypertrophy attained are markedly accelerated in the young animals as compared to the adults.<sup>3</sup> Repair of an infant's kidney might be greater and more permanent and efficient than from a similar pathologic condition in an adult. But the obstruction must be completely and permanently removed in order to secure this.

Before the surgical treatment is discussed, it may be of interest to present briefly in chronologic order the cases in which relief of this type of obstruction of the upper tract was effected by surgical intervention. Mistakes are often instructive; at least they have led me to consider the surgical procedure adopted in the last four cases and presented in detail in the summary as the most suitable for obstructive hydro-ureteral angularity.

#### REPORT OF CASES IN WHICH OPERATION WAS PERFORMED FOR OBSTRUCTIVE HYDRO-URETERAL ANGULARITY

CASE 1.<sup>4</sup>—D. V., a girl, aged 6 years, was admitted to the hospital in 1918 with the complaint of persistent pyuria for three years with marked frequency and burning on urination for the past three months. The child was normally developed but poorly nourished. The urine was cloudy, foul smelling, loaded with pus and contained a few casts. Plain roentgenograms were negative. The phenolsulphonphthalein output on admission was less than 10 per cent in two hours. Cystoscopic examination showed pronounced cystitis with bilateral hydro-ureters and hydro-nephroses. On account of the advanced nature of the trouble it was thought that nothing could be done, and after a few pelvic lavages the child was sent home. She reentered the hospital in April, 1920, and had done fairly well up to the last three weeks when the frequency, burning and pain on urination recurred worse than ever. Reexamination revealed the situation little changed. Total renal function

3. Hinman, Frank: Renal Counterbalance, Arch. Surg. **12**:1105 (June) 1926.

4. Reported as case 7 in Hinman, Frank: Renal Counterbalance: An Experimental and Clinical Study with Reference to the Significance of Disuse Atrophy, Tr. Am. A. G. U. Surg. **15**:241, 1922.

of phenolsulphonphthalein at this time was 14 per cent in two hours. Ureteral retention catheters were left in for several days, and there was a marked improvement in kidney function with the catheters in place. On May 8, 1920, the phenolsulphonphthalein test showed, by way of the left catheter, a return of: first hour, 10 per cent; second hour, 20 per cent; whereas, by way of the bladder from the right kidney, only a faint trace during the first hour and 3 per cent during the second hour were obtained. Previous to the use of the retention catheter, only a slight trace of phthalein had ever been obtained from either kidney. At operation,



Fig. 7 (case 1).—Cystogram with left ureteral catheter in place taken just a few weeks before the last operation, at which from 8 to 9 cm. of each ureter was resected at its lower end and the open end reimplanted into the bladder.

in May, 1920, a left ureteropyeloplasty was performed. The upper ureter was freed of adhesions and straightened of its angularities but even then, when left to itself, would coil back into nearly its original position, producing an apparent valvelike kink at the ureteropelvic juncture. A Heinecke-Mikulicz procedure was performed at this point, the same as in pyloroplasty, with the idea of relieving this obstructing angle. Two weeks later the total renal function, as shown by the phenolsulphonphthalein test, was: first hour, 10 per cent, and second hour, 15 per cent. Three weeks later the output during the first hour was 20 per cent and during the second hour, 15 per cent. On June 2, one month later, with the ureteral catheters in place,



the return during the first hour was 30 per cent and the second hour, 30 per cent, a satisfactory total of 60 per cent. On June 8, a similar operative procedure was performed on the right side. On July 3, the total phenolsulphonphthalein output for the first hour was 20 per cent and for the second hour, 10 per cent, ureteral catheters not having been used for a week or so. The patient was discharged on July 11.

The patient reentered the hospital on Aug. 9, 1920. The general condition had improved; she had gained 7 pounds (3.2 Kg.); the wounds in both kidneys had completely healed, but between July 31 and August 5 there were fever, nausea and vomiting, and the amount of urine decreased and became quite cloudy, with a foul odor. This condition lasted five days and then cleared up completely. On August 9, the total phenolsulphonphthalein output for the first hour was 25 per cent and for the second hour, 25 per cent. The urine still showed numerous pus cells and many rods. During this month, a number of pelvic lavages were given.

On Dec. 3, 1920, the phenolsulphonphthalein output for the first hour was 20 per cent and for the second hour, 15 per cent. The patient had not been examined subsequent to this date, up to May 17, 1928, a period of almost eight years. She was heard from in April, 1922, and her condition had remained satisfactory; she was gaining, going to school and had not had any further febrile attacks.

Just eight years after the second ureteropyeloplasty, on May 17, 1928, the patient returned to the hospital for observation at my request. She was a healthy looking girl of 16, and had a good color and no particular complaints. Puberty occurred normally, but the urine still showed much pus and the renal function, as shown by phenolsulphonphthalein, was low, only a trace of the dye appearing in two hours. The condition of the upper tract is illustrated in figure 7. As formerly, renal function immediately improved under retention ureteral catheters. The day of entry, the phenolsulphonphthalein output was only 5 per cent in two hours.

Can anything be done at this late date to stop the progressive hydro-nephrosis and bring about repair? As things are, this girl will never reach her third decade. The plastic operations performed eight years ago have been a failure because of the obstructive conditions below in the angular ureter.

This patient has been operated on again and the operation performed is described later in the paper.

CASE 2.—B. C., a girl, aged 4 years, was brought to the hospital for examination because of a persistent enuresis and marked frequency of urination during the day. The child had made a poor gain in weight for two years and had not gained for the last seven months. The urine was purulent and showed many motile rods. There was a 31 per cent output of phenolsulphonphthalein in two hours. The blood chemistry was normal. Plain roentgenograms were negative. Cystoscopic examination showed a mild trabeculation of the bladder with a capacity of about 100 cc. Obstructive conditions could not be seen at the neck or in the urethra. Both ureteral orifices were slightly relaxed and dilated and easily catheterized. The urine from the right kidney was clear and free from pus and that from the left, cloudy and quite purulent. On Aug. 21, 1926, the relative function showed: right, an output of 25 per cent; left, a faint trace in thirty minutes; on August 24, after the retention ureteral catheter was inserted, the output was: right, 20 per cent and left, 10 per cent in thirty minutes. The ureteropyelograms in this case are shown in figures 8 and 9.

On September 4, on account of a peculiar mucus fold over the left ureteral orifice, which seemed in some way to obstruct its outlet, the orifice was slit open with the fulguration needle and two retention catheters inserted. Marked reaction followed this procedure, and a tender, painful mass developed in the left upper quadrant; this condition was accompanied with vomiting and acidosis. On September 13, a left pyelostomy for drainage was performed, but the pyrexia continued and catheterization now revealed a marked infection of the right kidney. The child's condition was poor.



Fig. 8 (case 2).—Right ureteropyelogram, showing a mild degree of hydro-ureteral angularity as compared to the opposite side illustrated in figure 9. This picture should be compared with that just recently obtained, figure 10.

On September 18 a right nephrostomy was performed, with only slight improvement. The fever and sepsis persisted, so that on October 26 a left nephrectomy was considered necessary. Following this, there was immediate and marked improvement. On November 8 the temperature was normal; the child was gaining in weight and appeared well and had a total renal output of 67 per cent of phenol-sulphonphthalein in two hours. The right nephrostomy opening had closed, and the child left the hospital.

After discharge she had several attacks of pyrexia with nausea and vomiting. In three of these she was so ill that a right retention ureteral catheter had to be placed, improvement always following. For several months she had been gaining, but the urine was still purulent.

On May 12, 1928, she came back for observation. The total phenolsulphonphthalein output was only 8 per cent. The right ureteropyelogram showed definite progression in the degree of hydronephrosis on the remaining right side (fig. 10;



Fig. 9 (case 2).—Left ureteropyelogram, showing advanced degree of hydro-ureteral angularity with hydronephrosis. This kidney was removed.

compare with fig. 8). It was thought that unless free drainage was established, it would not be many years before renal insufficiency occurred. Because of this conviction, another operation was advised. On June 2, 1928, another operation was performed, which is described later in the paper.

**CASE 3.—History.**—F. W., a girl, aged 8 years, was admitted to the hospital for examination and treatment of enuresis. She was an inmate of the California School for the Blind, her eyesight having been lost between the ages of 1 and 2 years following scarlet fever, supposedly because of a staphylococcus infection. The

urine showed a faint trace of albumin and was loaded with pus cells and many motile rods, but no casts. The renal function showed an output of 4 per cent phenolsulphonphthalein in the first hour and of about 3 per cent in the second hour. Plain roentgenograms were negative. The urologic study showed a bilateral infection and dilated corkscrew ureters and hydronephrosis. The loops in the ureter seemed in themselves to produce definite obstruction as shown by the ureteropyelograms of figures 11 and 12.



Fig. 10 (case 2).—Right ureteropyelogram taken just before the last operation, showing the advance of the hydro-ureteral angularity and hydronephrosis of this remaining kidney.

*Operation.*—On Sept. 24, 1927, left nephrostomy, right nephrostomy and resection with reanastomosis of a portion of the upper right ureter were performed. The left kidney was exposed, revealing a markedly dilated pelvis and pronounced angularity of the hydro-ureter. The twists and bends were bound together by dense adhesions that were freed with considerable difficulty. After the angularities were freed, the ureter seemed to be from 8 to 10 cm. longer than previously, but straightening it out seemed to free it of any obstructive condition and so it was not resected. The patient was turned and a right lumbar incision made, exposing a



markedly lobulated hydronephrotic right kidney. The ureter on this side was more tortuous and dilated than the left, and these tortuous angularities were bound together with adhesions, as had been the case on the opposite side. After the ureter was straightened, it was 12 cm. longer than before, and a portion about 8 cm. in length was resected, the two ends being anastomosed. There was marked collapse of the kidney following emptying of its pelvis, which indicated that not much secreting parenchyma was left. A drainage tube was placed through an opening in the pelvis down the ureter through its point of anastomosis with the

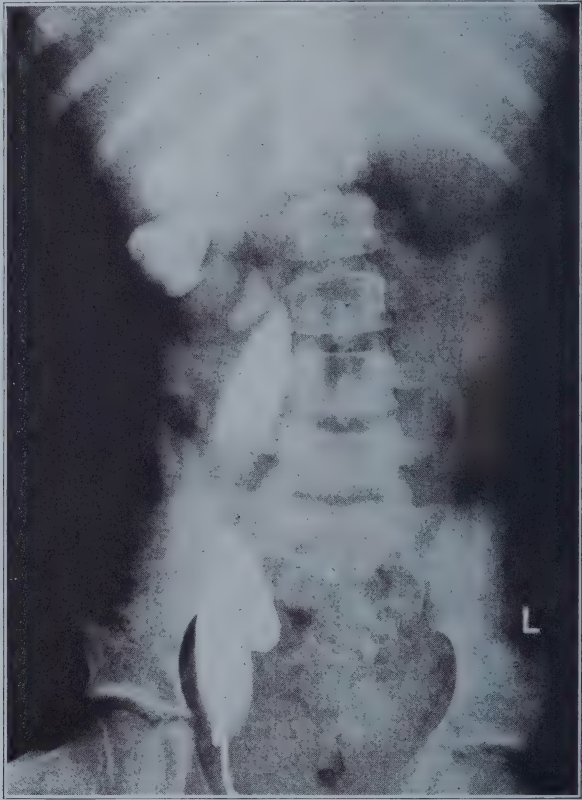


Fig. 11 (case 3).—Right ureteropyelogram, showing the advanced hydro-ureteral angularity of a girl, aged 8. The left side shows much less back-pressure change, as shown in figure 12.

pelvis and another tube passed through the same pyelotomy opening up into the kidney pelvis. A nephrostomy opening was not made. Convalescence was not particularly complicated; the tubes were frequently irrigated, and when the tubes drained well the temperature would remain about normal. There was improvement in the general condition, but on November 7, both the catheters came out; the temperature rose to 40 C. (104 F.), and the urinary output was markedly diminished. On account of the low hemoglobin content and red blood cell count, the patient was given two transfusions with citrate of whole blood on October 29 and on November 16. On account of the definite improvement in the general condition

as long as the catheters drained and the immediate setback with their removal, operative treatment of the lower ureters was considered necessary.

*Second Operation.*—On Nov. 17, 1927, a midline suprapubic incision was made; the bladder was exposed and the peritoneum dissected back, exposing the right ureter which was found to be markedly dilated and tortuous. There was a pronounced kink or angularity in the lower third about which the ureter was quite markedly fibrous and thickened, giving the impression of a large, round stone in



Fig. 12 (case 3).—Left ureteropyelogram, showing rather marked hydro-nephrosis but less marked hydro-ureteral angularity.

the ureter. It was found necessary to resect about 4 cm. of this portion of the ureter, reanastomosing the ureteral ends. This was the ureter that had had 8 cm. of its upper portion removed fifty-three days previously. An investigation of the lower left ureter was not attempted on account of the patient's rather poor condition after the foregoing operation was completed. The postoperative course was satisfactory. The suprapubic tubes were removed completely on the tenth day, and the incision had completely healed before the twentieth. The general improvement was much more marked than that following the first operation. The patient's general appearance was good; she had a good appetite, had not had fever for the

last four weeks and voided normally; the urine, however, was still infected. Total renal function as shown by the phenolsulphonphthalein test on Jan. 17, 1928, was 60 per cent. On May 17, 1928, the condition was only fair. The suprapubic fistula periodically opened and drained for a few days. Total renal function was 28 per cent.

The three surgical cases reported were all in girls in whom obstructions of the lower tract were not found, a condition that has been designated by some as congenital atony of the whole urinary tract. The primary factor at the bottom of these progressive changes is not known. It is worthy of note that the degree of change in the right and left upper tract was unequal when these patients were first seen. In one (case 2) the bladder had a small capacity (100 cc.) with mild hypertrophy of its muscle walls, although obstruction was not found. The right kidney showed only a moderate hydronephrosis and it functioned well as compared to the left kidney, but within two years there had been marked advance in the back-pressure changes of this remaining kidney. Whatever the initial lesion or defect that starts the ureteropelvic apparatus to its march of dissolution, when the condition is bilateral it is fatal. But the marked ureteral changes of hypertrophy and angularity are not consistent with atony. They are the well recognized effects of obstruction and can be reproduced in animals by partial ureteral blocks of the lower portion. A satisfactory explanation is wanting, but the marked improvement on catheter drainage is an indication that these cases are not hopeless and that continued efforts to find a means of relief may lead one eventually to stumble on the true explanation of their pathogenesis. The appearance of the bladder neck in the two girls that were operated on as seen suprapubically (cases 1 and 2) is of interest. The iris-like folds of mucous membrane were not recognized cystoscopically. The inequality of the changes on the two sides is also a marked characteristic in the following cases in boys.

CASE 4.—*History*.—B. B., a boy, aged 5½ years, was referred by Dr. William Palmer Lucas on account of a persistent pyuria which had existed for the last three and a half years, ever since an attack of pneumonia. During this time he had repeated attacks of fever of a few days' duration, usually from two to three weeks apart. Recently, he had enuresis and marked frequency of urination. The urine was loaded with pus and showed motile rods and a faint trace of albumin; the phenolsulphonphthalein output was 15 per cent for the first hour and 20 per cent for the second hour. Plain roentgenograms were negative. Cystoscopic examination showed an enlarged hypertrophied verumontanum with redundant mucous membrane above, somewhat plicated into folds, but no definite valve formation. The bladder wall was not trabeculated, and there were no deep cellules. The right ureteropyelogram is shown in figure 13 and the left in figure 14. The verumontanum was partially destroyed by fulguration so as to remove the obstruction, and the ureters were catheterized and the kidney pelvis lavaged on several occasions. The patient's general condition definitely improved. The total phenolsulphon-



phthalein output on Sept. 8, 1927, was: first hour, 55 per cent and second hour, 18 per cent. The urine showed from 40 to 60 pus cells, an occasional red blood cell and colon bacilli, but no casts. The following note was sent his father following the last examination:

"We have given Billy several conservative treatments in the hope that we would be able to relieve the progressive hydronephrosis that he has, but on checking up conditions today there seems to have been no improvement and I feel that something more radical should be done for him. He has a very advanced hydronephrosis of his right kidney and a markedly dilated and tortuous ureter on this side. The left side shows a similar condition but not nearly so marked. It would be possible



Fig. 13 (case 4).—Right ureterogram, which shows advanced degree of hydro-ureteral angularity and rather marked hydronephrosis, much more than on the opposite left side (fig. 14).

to relieve this obstructive condition by straightening out and shortening the ureter and if this is done at his time of life, one might get marked repair of the kidneys. If nothing is done, I think it certain that in time he will lose the right kidney because of the progressive hydronephrosis and that it would have to be removed and one would be fearful that the same progressive condition might continue on his good left side."

*Operation.*—On Oct. 6, 1927, the right ureter was exposed and found to be markedly tortuous and coiled on itself, the coils being plastered together with entering blood vessels and fibrous adhesions. Even after the ureter was completely



freed, it would immediately coil up, showing the points of marked secondary valvular-like obstruction because of the angularity. In order to relieve this, it was thought necessary to take out a section of the ureter, as was done in the previous case, and about 5 cm. of the upper third was removed and the two ends anastomosed. Attempts to follow the ureter down to the bladder through the lumbar incision encountered difficulty and after the anastomosis was completed, a catheter having been placed down the ureter through the kidney and pelvis by a nephrostomy opening, the patient was turned on his back and, through a right rectus incision, the lower ureter exposed extraperitoneally. A pronounced angularity was found here

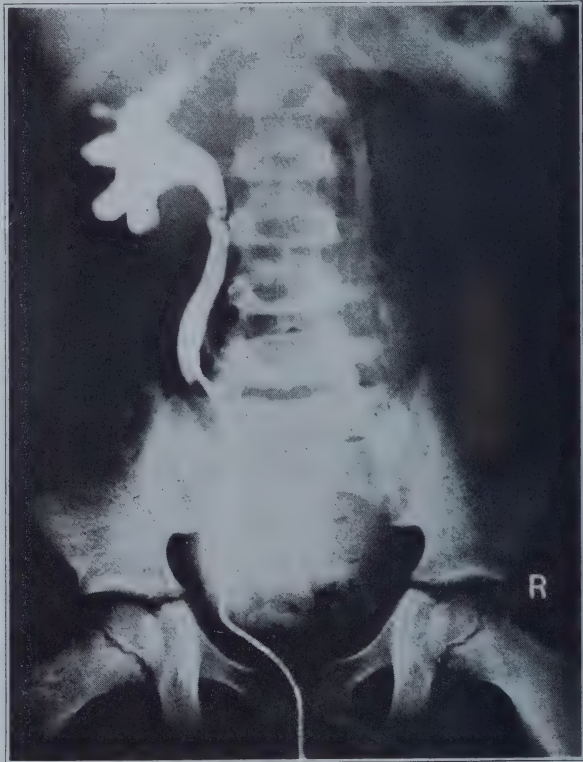


Fig. 14 (case 4).—Ureteropyelogram of the left side, which shows a much less degree of back pressure change than the right side (fig. 13).

also. Retrograde catheterization met obstruction at the ureterovesical junction. Careful inspection revealed quite a marked valvelike condition at this point. About 7 cm. of this lower portion of the right ureter was resected and the end reanastomosed into the bladder, the ureteral orifice having been removed with the resected portion. This left a straight ureter. The right side was not disturbed.

The patient had quite a febrile reaction following the operation. The kidney was kept lavaged through the nephrostomy tube which was removed and reinserted several times before this opening healed. At the time of the lower ureteral operation, it was thought best to establish suprapubic drainage, and by means of the nephrostomy and suprapubic tubes lavage of the whole urinary tract on the left

side was possible. The nephrostomy tube was permanently removed on the twentieth day; following this there was quite a rise of temperature. A urethral catheter was inserted, and the temperature returned to normal a few days later. The nephrostomy opening quickly closed, and with the urethral catheter in place, suprapubic drainage had ceased by the twenty-sixth day. From now on for the next ten or twelve days, whenever the retention urethral catheter was removed, there was a rise of temperature which subsided with reinsertion of the catheter.

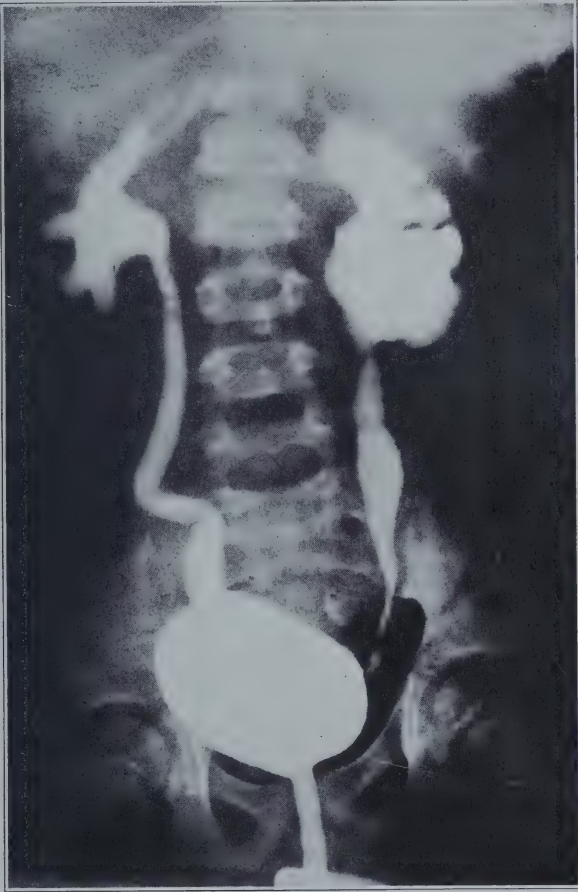


Fig. 15 (case 4).—Cystogram taken postoperatively, showing the straightened, though somewhat constricted, condition on the right side. The left ureter had been straightened at the time of operation but no resection done.

On the twelfth of November the boy's condition was markedly improved; he voided normally, though frequently; the total phenolsulphonphthalein output without the catheter for the first hour was 33 per cent and for the second hour 35 per cent. On November 26 a cystogram was taken (fig. 15) which showed that the left ureter was dilated in its upper third but that it was draining freely from the kidney pelvis. The patient was discharged from the hospital on December 8,

sixty-three days following his operation, and he had been completely afebrile for the last ten days before discharge. His operative wounds had all healed completely, and he was voiding normally. He had a normal renal function, but the urine still showed numerous pus cells. His general condition at the time of discharge was good.

He returned to the office for observation in May, 1928. In appearance he was a different boy than before operation; he had gained weight, and his general condition was improved. The total amount of phthalein in two hours as shown by the test was more than 60 per cent.

CASE 5.<sup>5</sup>—*History*.—K. D., a boy, aged 2 years, was referred by Dr. Langley Porter for examination on account of continual dribbling of urine and pyuria. He had been born at full term, delivery being normal. The feeding and developmental histories were normal. He had measles at the age of 2 months. Otherwise, the family history was unimportant. Since birth the mother had noticed that the patient could not void with a normal stream of urine but that there seemed to be a continual dribble. At the age of 6 months, a slight bloody urethral discharge was noted for the first time. This occurred again at 9 months. The child had always been fussy and irritable, crying while attempting to void. Cystoscopy and pyelography revealed a valvelike obstruction in the posterior urethra with hydro-ureters and hydronephrosis.

*Physical Examination*.—The child was anemic, sallow and undernourished; he was irritable and fussy, which made examination difficult. Marked puffiness of the face was present. The head was otherwise normal. The heart, lungs and abdomen were normal. There was no evidence of edema of the extremities. Examination of the blood showed: hemoglobin, 55 per cent; red blood cells, 3,300,000; white blood cells, 16,200; polymorphonuclear, 71 per cent; small leukocytes, 21 per cent; large mononuclears and transitionals, 8 per cent. On examination, the urine was pale yellow and normal, with a specific gravity of 1.002; it did not contain sugar and only a faint trace of albumin. Microscopic examination revealed numerous white blood cells and motile rods, an occasional red blood cell, but no casts. The phthalein output was: first hour, 7 per cent; second hour, 20 per cent; total, 27 per cent.

With a catheter in each ureter a right pyelogram was made which showed a markedly dilated and tortuous ureter and atrophic kidney on the right side. The left catheter was coiled up several times in the lower left ureter, indicating a large ureter on that side.

*Operation*.—Suprapubic cystotomy was performed with the patient under gas and oxygen anesthesia. The valves attached to the verumontanum and the posterior urethra were split. A bar formation at the vesical neck was excised. The left ureteral orifice was found gaping. The right ureteral orifice was slit open and several ounces of heavy purulent urine allowed to escape. Drainage was instituted through a tube drain and the wound closed in the usual manner.

It was possible to follow this boy closely from the time when the obstruction was removed from the lower tract, and the renal function increased from 27 to 65 per cent (February, 1924). There was a gradual loss of function so that within the last few months (1928) only a faint trace of phenolsulphonphthalein would be found on repeated tests in two hours, but on Jan. 9, 1928, the blood urea showed a nonprotein nitrogen of 42.2 mg. per hundred cubic centimeters. On reexamination at this time the right pyelogram showed a markedly dilated and tortuous ureter

---

5. Case 5 is the same as case 3324 in Hinman, Frank (footnote 1, p. 82).



and a pelvis and kidney shadow suggestive of secondary renal atrophy (fig. 16). The catheter in the left side was curled up in a small area (fig. 17). On account of there not being any nitrogen retention, it was thought that there might be some chance of repairing the left kidney by relieving the ureteral obstruction due secondarily to loops and angularities, as has been done in previous cases. The right ureteropyelogram indicated a secondary renal atrophy much like that found on the right side in another case, in which nephrectomy was performed. The parents were advised that operation might delay or improve an otherwise fatal malady.



Fig. 16 (case 5).—Right pyelogram showing a markedly dilated and tortuous ureter and a pelvis and kidney shadow suggestive of secondary renal atrophy.

*Second Operation.*—In January, 1928, the peritoneum was dissected back, exposing the kidney and ureter, the latter being markedly dilated, tortuous and angular. The coiled condition in the upper third was relieved by carefully dissecting off the adhesions which bound it, and then the ureter was carefully dissected free through this lumbar incision to its entrance into the bladder. There was a similar markedly tortuous and coiled condition in the lower third of the ureter, densely bound with adhesions which had to be cut before the ureter could be straightened. After the



ureter was straightened at both ends, the most marked angularities seemed to be at the end portions; it was easily twice as long as a normal ureter. It was divided at the pelvis by an oblique incision, and the cut end could then be raised so that it reached without stretching above the left shoulder of the patient. The amount of ureter resected was 19 cm. (fig. 18) enough being left for anastomosis to the pelvis. At the time the ureter was divided for anastomosis, it was also cut obliquely so that the resuturing would be in an oblique direction and not circular. Before the ureter was anastomosed to its pelvis, a nephrostomy opening was made and a no. 12 catheter, well perforated at the end and about 12 cm. up, was passed into the pelvis and on into the ureter, so that the upper openings of the catheter

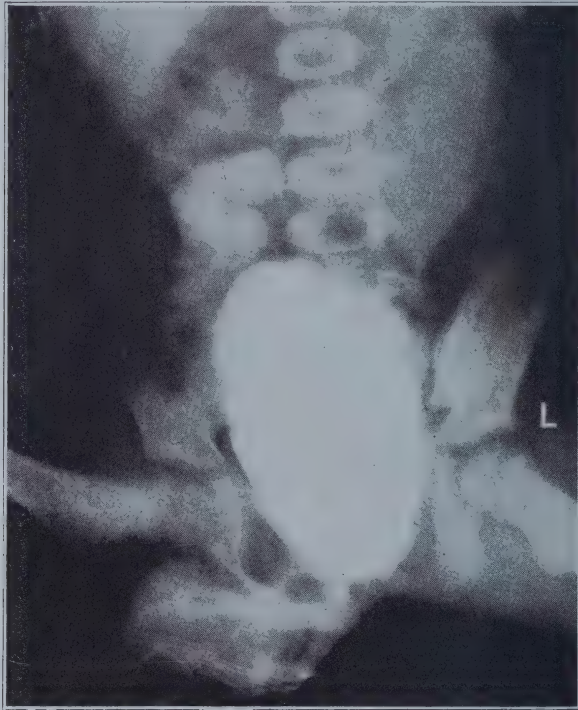


Fig. 17 (case 5).—Ureteropyelogram of the left side showing a markedly dilated and tortuous ureter with advanced hydronephrosis above.

drained directly from the pelvis; the catheter passing on into the ureter splinted the point of anastomosis. After the lower third of the ureter was straightened, catheters could be passed easily into the bladder.

*Postoperative Course.*—The following postoperative notes are given in some detail because this case merits most careful study. In this case a patient with a typical obstruction of the posterior urethral valve showed complete recovery of renal function after the removal of the valves, but two years later was on the verge of having uremia as a result of renal insufficiency.

*First Day:* The patient's temperature rose to 40 C. (104 F.) rectally. The general condition was good; the fluid intake was 3,400 cc. and the measured output,

1,400 cc. The patient took fluid well by mouth. The nephrostomy tube drained well and was irrigated twice that day with 1:10,000,000 potassium permanganate solution.

Second Day: The highest rectal temperature was 39 C. (102.2 F.). There was slight serohemorrhagic drainage through the extrarenal rubber drain. The nephrostomy tube was draining well, and the patient's condition was satisfactory.

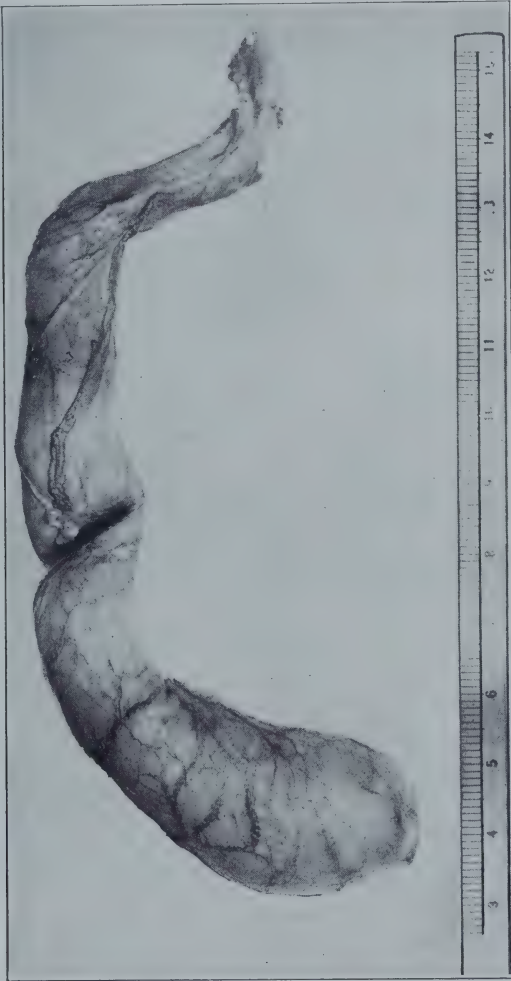


Fig. 18 (case 5).—Portion of ureter resected from the upper portion. The pronounced dilatation and elongation are at once obvious. This amount resected is about the same length as that left in, as shown in figure 19.

Fourth Day: The highest temperature was 38.6 C. rectally (101.4 F.); the pulse rate was 110; it was regular and of good volume. The patient occasionally voided small amounts of urine by way of the urethra, and still a slight amount of drainage occurred at the site of the extrarenal drain tube. The nephrostomy tube

drained well. The extrarenal tube was pulled out about 4 inches (10.1 cm.) and cut off flush with the wound. After intralumbar injection of phthalein the urine collected through the nephrostomy tube showed: first hour, 140 cc., 24 per cent; second hour, 130 cc., 15 per cent; total, 270 cc., 39 per cent. This is a most remarkable return of function four days after free drainage of the kidney had been established; all previous tests for many months before operation had shown only a trace or no phthalein at all.



Fig. 19 (case 5).—Ureteropyelogram of the left side taken postoperatively. The point of anastomosis of the upper part of the ureter that was sutured to the pelvis in an oblique manner is seen to be quite patent. However, there seems to be some constriction of the lower portion of the ureter as it enters the bladder and in this case it will be necessary to perform dilatations of this portion in order to get freer drainage. The author now believes that it would have been preferable to have resected the necessary amount of this elongated ureter at its lower portion so as to have thoroughly removed this constriction at its vesical end. Compare with figure 17.

Fifth Day: The drainage tube outside the kidney was removed; the nephrostomy tube was draining well; it had been irrigated with protargin mild



solution to determine whether the irrigation fluid passed on to the bladder. Following irrigation with this solution through the nephrostomy tube the patient urinated, and the urine voided was highly stained with the protargin mild solution, showing free drainage through to the bladder.

Eighth Day: The patient's temperature had been about 37.8 C. (100 F.) for the last four days; his general condition was remarkably good; he ate well, took fluids freely, seemed comfortable and contented and his appearance was altogether different from that previous to operation. The nephrostomy tube was draining well.

Ninth Day: Urine collected through the nephrostomy tube showed a phthalein return of: first hour, 21 per cent; second hour, 15 per cent and total, 36 per cent.

Fourteenth Day: The wound had healed except at the nephrostomy opening where the tube was still attached.

Sixteenth Day: Cystoscopy was performed, and ureteral catheters were placed on each side. These catheters were retained and were irrigated with protargin mild solution every two hours.

Nineteenth Day: The ureteral catheters were removed and a urethral retention catheter placed. The phthalein test showed: first hour, a return of 25 per cent; second hour, 20 per cent and a total of 45 per cent.

Twenty-First Day: The urethral catheter was removed.

Twenty-Third to Ninety-Second Day: Retention ureteral catheters were placed; they were irrigated every two hours as before, this time with mercuriochrome-220 soluble. Connell suction was applied to the ureteral catheters, and they were removed on the twenty-seventh day. A retention urethral catheter was placed on the twenty-ninth day and through and through irrigations instituted. Ureteral catheters were again placed on the thirty-ninth day. The urinary discharge from the nephrostomy tube had been purulent, and the temperature during the last few days had been between 39 and 40 C. (102.2 and 104 F.). The total phthalein output on the forty-second day was somewhat diminished, there being a total of only 21 per cent. On the fifty-eighth day the hemoglobin was 45 per cent, the red blood cells 2,864,000, and the white blood cells, 7,860; the systolic blood pressure was 94; diastolic, 56. The patient was given a transfusion of 195 cc. of citrated blood without reaction; again on the sixty-sixth day he was given another transfusion of 100 cc. of citrated blood without reaction. The condition was now satisfactory. He had not had a rise in temperature for nine days, and he took fluids well and ate well. On the sixty-eighth day, the hemoglobin was 65 per cent; the red blood cells numbered 3,472,000 and the white blood cells, 7,900. The nephrostomy tube was removed on the sixty-fourth day, and all drainage tubes and catheters removed. The patient was discharged on the ninety-second day after operation. The temperature had been normal since the sixty-fifth day except for an occasional slight rise above 37 C. (98.6 F.).

The patient was seen several times after he returned home; his general condition remained satisfactory, and he did not have any febrile attacks. The urine was clear but still showed some pus. The last phthalein test on June 15, 1928, showed: first hour, 100 cc., 20 per cent; second hour, 100 cc., 6 per cent, a total of 26 per cent. Figure 19 shows the postoperative condition by ureteropyelogram.

CASE 6.—*History*.—F. T., a boy, aged 7, was seen in June, 1927, by Dr. Langley Porter and admitted to the pediatric service of the University Hospital for observation. His main complaints were loss of weight, exhaustion, hay-fever and asthma. Cystoscopy was performed in January, 1927, by Dr. Meads of Oakland on account of a persistent pyuria, and the patient wore a retention urethral catheter from September until May. Since birth he had had periodic attacks, lasting from two to three days, of loss of appetite with vomiting and a rise of temperature to 104 F.



or over. A cystogram was taken in June, 1927 (fig. 20), demonstrating the bilateral hydro-ureteral angularity with hydronephrosis. A phthalein test in July showed a return of 6 per cent the first hour and 10 per cent the second hour, a total of 16 per cent. The urine was cloudy, loaded with pus and some red blood cells. Examination of the blood showed: 80 per cent hemoglobin; red blood cells, 3,930,000, and white blood cells, 12,400. The phthalein test on July 13, 1927, showed a return of 7 per cent the first hour and 19 per cent the second hour, a total of 26 per cent. During this stay in the hospital the patient had several marked



Fig. 20 (case 6).—Cystogram showing bilateral hydro-ureteral angularity with hydronephrosis.

febrile attacks, lasting three or four days, the temperature rising to 40 C. (104 F.). Following his discharge from the pediatric service, the patient was instructed to return weekly for ureteral catheterization and pelvic lavage. This was kept up rather regularly, but there was no improvement in the general condition, only slight improvement in function. The parents were advised that the ureters should be straightened surgically.

The patient was readmitted to the hospital on the urologic service on May 30, 1928. The phthalein output showed decided improvement following ureteral catheterization and pelvic lavage, showing on the day of admission a return of 30 per cent the first hour and 21 per cent the second hour, a total of 51 per cent.

*Operation.*—On May 31, 1928, with the patient under gas and oxygen anesthesia, a left nephrostomy and bilateral lower ureteral resection with vesical implantation were performed. He was placed on his right side as for an operation on the kidney, and the lower pole of the kidney was exposed and the ureter freed of its folds and adhesions in its upper portion. Through a small incision in the pelvis, the nephrostomy probe was pushed back through the thinnest portion of the kidney at its middle so that the nephrostomy tube would drain directly through the lumbar incision. A catheter tip that had been perforated was tied to the end of the probe and drawn back through the kidney pelvis and then threaded on down the ureter so as to splint its upper portion. After the lumbar wound was closed, the patient was placed on his back and a long midline incision made, the bladder being exposed. By careful stripping of the peritoneum, the ureter was successfully exposed and straightened on each side all the way to the kidney pelvis. About 8 cm. of the lower portions of each ureter was removed and the remaining ends implanted into the open orifices left after the ureterovesical end was resected. Catheters were threaded inside the bladder up these dilated ureters for purposes of drainage and a pessar catheter left in suprapubically through the cystotomy opening. The bladder was closed about these tubes.

The postoperative condition was satisfactory, although during the first twenty-four hours the drainage through the tubes was not satisfactory. After the second day the tubes drained well, and the patient's general condition at this time was satisfactory. He returned for observation three months after discharge, in excellent general condition, with a clear urine and a total phthalein output of more than 60 per cent in two hours.

#### OPERATIVE PROCEDURES IN CASES 1 AND 2

*CASE 1.*—The patient (previously described in this paper as case 1) was readmitted for operation on the lower ureters on May 29, 1928. The phthalein test on admission was: first hour, trace; second hour, 6 per cent. On May 30, the test showed: first hour, trace; second hour, 5 per cent. On June 1, the output was: first hour, 5 per cent; second hour, 3 per cent, a total of 8 per cent. The urine was fairly clear, with a specific gravity of 1.010; it showed a faint trace of albumin, no acetone or diacetic acid, and there were from 4 to 5 pus cells in each high dry field, but no red cells.

Operation was performed on June 2, 1928, under gas and oxygen anesthesia. On account of previous plastic operations at the ureteropelvic juncture, it was not considered necessary to perform nephrostomy. Through a midline suprapubic incision, the peritoneum was stripped back on each side and the markedly dilated hydro-ureters exposed and freed of all adhesions and angularities. It was necessary to ligate and divide the deep epigastric vessels on each side in order to make this exposure satisfactorily. The round ligament and the uterine vessels were exposed extraperitoneally and the ureter freed beneath and pulled up below these structures. There was definite narrowing of the ureter in its vesical portion so that one could pass a probe from above into the bladder with difficulty. The ureterovesical ends were resected, and the ureter, markedly elongated, after having been straightened was drawn through the opening in the bladder. About 8 or 9 cm. of the lower end of each ureter was removed and implantation secured with no. 2 chromic catgut, a large, long, rubber drainage tube having been passed retrograde from the bladder up each hydro-ureter. These tubes were brought out suprapubically alongside a pessar catheter and the bladder sutured about these three tubes. Inspection of the bladder neck showed that there was quite a fold of mucous

membrane posteriorly in the nature of a median bar which seemed to be somewhat obstructive; this bar was removed with the radio knife just as is done in the suprapubic operations for median bar, the bleeding points being tied off or thrombosed with the coagulation current. The patient's condition following operation was satisfactory.

CASE 2.—The patient (previously described in this paper as case 2) was readmitted for operation on the lower ureter of the remaining kidney because of continued febrile attacks, gradual loss of function and the fact that the ureteral hypertrophy and angularity and hydronephrosis were definitely progressive, as demonstrated by the recent ureterogram shown in figure 10. The phthalein output on the day of admission was: first hour, 50 cc., 5 per cent; second hour, 70 cc., 9 per cent, a total of 14 per cent.

Operation was performed on June 2, 1928, under gas and oxygen anesthesia. A midline suprapubic incision was made as in the previous case, and the peritoneum on the right side was stripped back after division of the deep epigastric vessels, a markedly dilated and angular ureter being exposed. This ureter was freed of its adhesions, straightened and drawn out below the round ligament and uterine vessels, as already described. By careful dissection its entrance into the bladder could be demonstrated and was found to be quite markedly constricted, so much so that even after a small incision was made in the dilated ureter just above the bladder it was not possible to pass a no. 6 or 7 probe into the bladder. The ureterovesical end was resected, a round opening being left at this side of the bladder, through which the elongated ureter was drawn, it being straightened above. It was implanted with chromic no. 2 sutures without tension, which left about 7 or 8 cm. projecting in the bladder. This was removed, a slit opening of that portion of the ureter projecting intravesically being left. A long no. 14 rubber drainage tube was threaded back through the bladder up the dilated ureter to its pelvis and brought out alongside of a pessar catheter in the bladder as in the previous case, the bladder being closed tightly about these two tubes. The bladder neck in this child showed a barlike condition, similar to that in case 1, which was resected with the radio knife as in the previous case.

The surgical treatment given these three boys and three girls has many points for contemplation and study. Will the right side in case 4, which has been untreated, improve or deteriorate? There is now no obstruction of the lower tract and it should improve, but hydronephrotic atrophy was progressive in the short period before the left side was operated on as it was in the other two cases (5 and 6) after removal of the obstruction of the lower tract. Perhaps the valvelike condition found at the ureterovesical juncture on the left side in this case is a factor in the more advanced destruction on this side.

Will the remnant of ureter that has been isolated by resection of portions of its two ends survive and function? This radical measure seemed at the time the only solution in cases 3 and 4. But attention was focused too much on the conditions of the upper ureter. The possibilities of success would seem better when a portion of one end is removed, as in cases 5, 6, 1 and 2. One must look with suspicion on the uterovesical end, and, although resection of the ureteropelvic portion seemed necessary at the time in order to remove an obvious



obstruction, more recent experience leads to the belief that this is not necessary. The upper ureter can probably be satisfactorily straightened by merely freeing it of its adhesions if the slack is taken up by resection of the lower end.

Will the remarkable improvement that has been immediate in all cases be permanent? The initial removal of the obstruction of the lower tract benefited all similarly but only temporarily. The procedure in case 1 was unsuccessful though the immediate benefit was marked. In case 2, a nephrectomy was required subsequently to the initial operation. Have the surgical measures used in cases 3, 4, 5 and 6, and just recently in case 1 and on the remaining kidney in case 2, removed the cause of progressive hydronephrosis? The period since operation is too short in any of these to prove anything in this respect. One can say at least that none of these patients is in a more precarious condition than before operation, and in each one the improvement in renal function as indicated by the phenolsulphonphthalein test has been prompt and usually remarkable.

#### SURGICAL TREATMENT

In suggesting a surgical program of treatment in this group of cases, it is believed that nephrostomy and lower ureteral resection with reimplantation constitute the most logical and promising method. On account of the more advanced change on one side and severe infection, there will, of course, be occasional cases in which ureteronephrectomy is at once indicated and required. A number of children with a definitely unilateral obstructive condition, in whom nephrectomy seemed the logical procedure, have been seen. Abnormal vessels or bands at the ureteropelvic juncture or double pelvis and double ureter produce a simple hydronephrosis with or without secondary infection that clearly differs from the condition in the particular group under discussion. Indeed, the ureteral changes above an obstructing aberrant vessel in a recent case may be strikingly analogous to the more general changes under discussion. In cases showing obstructive hydro-ureteral angularity, whenever the retention catheter or surgical exposure of the kidney shows a fair amount of parenchyma, consideration of its preservation is in order, and the first and most valuable surgical procedure to effect this is a successfully functioning nephrostomy. It gives the free drainage during convalescence that may be essential to success, although it was omitted in reoperating in the last two cases, the reason being that in case 1 previous plastic operations had been performed at both ureteropelvic junctures and in case 2 nephrostomy had previously been performed on the remaining kidney. It was thought that these previous operations on the kidneys would complicate a quick and satisfactory nephrostomy. It seems well proved that the



pyeloplastic type of operation as first performed in case 1 does not meet the necessary requirements, and I consider it fortunate that it has been possible to follow this case for so many years and to know what the ultimate result is. It would also seem that resection of portions of the ureter at its two ends is unphysiologic. It is much better, provided satisfactory ureteral straightening can be effected, to resect and anastomose at one or the other end, preferable the vesical. Freeing the ureter of its adhesions and straightening it will not always relieve obstruction, as was found in cases 3 and 4, in which were definite obstructive conditions at both ends of the ureter due to angulations and adhesions. The ureter, of course, is known to get a rich blood supply at different levels, and the experience in the two cases in which portions of both ends were resected seems to show that the middle portion may receive sufficient blood even after isolation from its two ends. In freeing the kinks of their adhesions, however, one should be careful to preserve as much of the blood supply as possible, because at this time the complete procedure of treatment cannot have been definitely determined.

The postoperative stricture at the point of anastomosis of the upper ureter to the pelvis in case 3 indicates that the method of ureteral anastomosis requires careful consideration. Because of this experience the ureter was divided obliquely in one case so as to give a long line of suture at the point of anastomosis and to insure much less likelihood of stricture afterward. The fact that one is anastomosing a markedly dilated tube does not seem to be sufficient security against formation of stricture afterward. However, it has been possible to dilate the upper ureter in case 3, and I believe that the result in the end will be satisfactory.

From the experience so far at hand, the best surgical method of attack in the treatment for obstructive hydro-ureteral angularity may be outlined as follows:

*Step 1.*—With the patient lying on the side over a kidney pad, a short curved lumbar incision is made at the twelfth rib. By carefully stripping up the peritoneum, exposure of the lower pole of the kidney and its ureter is possible, and in most cases delivery of the lower pole is all that is required.

*Step 2.*—The kidney is first freed. A small opening is then made in the pelvis, through which the ureter and pelvis are explored by catheters, probes or the finger and the amount of potential renal parenchyma determined. It is not always necessary completely to deliver the kidney (previous functional tests are a better guide).

*Step 3.*—*Nephrostomy.*—With a curved forceps or a curved nephrostomy probe, which has been made for this particular purpose, an opening is made from the middle or upper major calyx to the surface of the kidney by gently forcing the blunt end of the instrument through the thinnest portion of the renal parenchyma, and the end of a fairly good sized rubber tube or catheter (12 to 14 F in diameter) seized in the clamp or tied on the end of the probe and pulled back into the kidney

pelvis and out the pyelotomy opening. If the child's condition is questionable, the operation can be stopped at this point, and one can wait to see the amount of improvement that nephrostomy drainage will secure before undertaking to remove the obstructing ureteral angularities. So far this has been necessary in only one of the cases, as this point had been determined by ureteral catheter preparation in all of the others, but ureteral catheterization was unsatisfactory or almost impossible in this one case (case 2).

Before deciding on the surgical steps to follow, one must first determine the obstructive conditions of the upper portions of the ureter. Previous ureteropyelograms or cystograms may have indicated what condition to expect, but one now has an opportunity to find out definitely. The whole ureter requires careful inspection and exploration. Because it is always possible that resections of portions of the ureter at both ends will be necessary in order properly to relieve obstruction, the blood supply to its middle third should be preserved, and this cannot be done safely if it is stripped free from above downward. But the peritoneum usually may be stripped off the anterior ureteral wall quite readily, all the way to the bladder, the ureter being left more or less undisturbed in its bed, and one can then free the tube in its upper and lower third and leave the middle portion alone until after inspection, if this seems advisable.

*Sept. 4.*—If it is decided that resection of a portion of the upper ureter will fulfil the requirements, then the middle third must be freed, irrespective of its blood supply, because it is only by traction and straightening that the obstructive angularities of the other end are removed. This would be impossible with the middle third fixed in position.

The ureter is divided obliquely at or near the pelvis and the length to be resected determined by pulling the unattached end up over the kidney. This redundant portion is then removed, also by an oblique incision, so as to give a long line of suturing at the site of anastomosis. The nephrostomy catheter previously placed is perforated at two points, the first near its end, the second at a good distance up (from 10 to 15 cm.); the catheter is then passed on down the ureter so that the higher perforations come to lie in the kidney pelvis, and the long end of the catheter which passes down the ureter splints it at the site of anastomosis. In those cases in which there is definite abnormality at the ureterovesical end that cannot be corrected through the lumbar incision or that requires resection, I believe it advisable to wait until the child has fully recovered from this first operation. As long as the nephrostomy tube drains well, the obstructions of the lower ureter are of no clinical importance but must be remedied, of course, before one can expect benefit to result. The nephrostomy opening may fail to close otherwise. This next step or operation is best performed through a midline suprapubic incision, as described in step 5.

If, after ureteral inspection and exploration, one decides that resection of a portion of the lower third will effect straightening of the middle and upper angularities and thus relieve their valvelike obstruction, and I believe that this procedure is much to be preferred, then after straightening the upper ureter and after the nephrostomy tube has been adjusted in the pelvis and the ureter, as already described, the lumbar wound is closed. It will usually be advisable to perform the next step as a second stage later.

*Step 5.*—The patient is placed in slight Trendelenberg position, and the bladder is exposed and the peritoneum dissected back at the side so as freely to expose the lower ureter. The ureter is freed, opened and thoroughly explored. I am convinced of the importance of this step because defects at the ureterovesical end must be common even though they have been demonstrated definitely in only three patients: one with a ureterovesical cyst, one with a ureteral pouch and another with constriction. Because of the marked elongation in these cases, simply freeing the ureter of its adhesions and straightening it will fail unless the slack is taken up by resection at one or the other portion. The ureter would simply coil up and become adherent again. Because of the significance of conditions at the vesical end as well as the more physiologic end-result, resections here should be given preference, and in most cases complete resection of the ureterovesical orifice is indicated.

#### SUMMARY

The surgical method of attack in the treatment for obstructive hydro-ureteral angularity may be summarized as follows: \*

*First Stage.*—Nephrostomy is performed on both sides or on the more diseased side, the upper ureters straightened and freed and then splinted with the nephrostomy tubes.

*Second Stage.*—The bladder and lower ureters are exposed through a midline suprapubic incision. Each ureter is straightened and freed either to its pelvis or, when nephrostomy has been done, to the free portion above. Enough of the lower portions are resected to take up the slack and, after the bladder is opened, they are implanted in the opening into the bladder made by resection of the old ureterovesical orifice. Large catheters are placed well up the ureters as splints and for drainage and lavage. The vesical neck is thoroughly inspected and any bar or contracture that is present is resected. The bladder is closed about a suprapubic drainage tube and the ureteral catheters.







FROM THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA HOSPITAL

PERINEAL PROSTATECTOMY

FRANK HINMAN, A.B., M.D., F.A.C.S., SAN FRANCISCO

story of perineal prostatectomy can be  
ten best as an encomium of one Ameri-  
surgeon. It is a one way operation, and  
as the first to blaze the trail. Failure dis-  
all who neglect the fundamental sign-  
up by him. These are facts generally  
iated. When this subject was suggested  
itation to contribute an article to this  
f Clinical Surgery, the reply was "most  
te."

as the editor had in mind such a discus-  
least an explanation of the surprising  
this operation. The majority of medical  
logists too, have been all dressed up for  
e in anticipation of a formal necropsy. In  
discussion of the technical details of peri-  
tatectomy can be of interest to a limited  
f readers for the reason that relatively few  
perform prostatectomy by way of the  
t. Those men who have followed success-  
perineal route take so nearly the same  
t the minor differences of technique are  
orth discussing and are therefore of little  
even to the small group most familiar  
operation. However, other surgeons, in-  
uprapubists, may be sufficiently inquisi-  
e interested in a general discussion: first,  
atomical principles that limit the perfor-  
this operation practically to one way and  
y only; second, of the few technical mod-  
in use as related to these principles; and  
the best way by which these principles  
ught as indicated by the experience of  
enty-five years of life.

ATOMICAL PRINCIPLES OF PERINEAL PROS-  
TOMY AND CERTAIN MODIFICATIONS OF  
OD

bjectives of the perinealist are: Non-in-  
he rectum and of the external sphincter,  
tion of the ejaculatory ducts and of the  
sphincter, and complete enucleation of  
erplasia with hæmostasis. Rectal fistula,

incontinence of urine, or persistence of urinary ab-  
normalities are the penalties of failure. Clean-cut  
dissection of the perineum in the proper line of  
anatomical separation of the rectum from the  
genito-urinary layer of perineal muscles and pros-  
tate is absolutely essential and by far the most  
important step from a technical standpoint, the  
one that has caused the most grief to both the  
surgeon and the patient. Once expert in exposing  
the prostate without the least damage to rectum  
and these perineal muscles, the surgeon is master  
of the situation. Methods of enucleation and of  
repair, while important, can vary just a little ac-  
cording to individual preference. But there is no  
possible variation in the line of dissection to ex-  
pose the prostate—go too high and you encounter  
the bulb and bleeding; pass this and continuing  
too high you expose the triangular ligament, even  
Cowper's gland, and persisting will invariably in-  
jure the external sphincter; go too low, and you've  
got a hole in the rectum. Perineal prostatectomy,  
therefore, anatomically speaking consists of three  
stages: (1) exposure of the prostate, (2) enuclea-  
tion, and (3) repair with hæmostasis.

*Exposure.* Good surgical exposure of the pros-  
tate is no doubt possible without special instru-  
ments. Possibly it can be done with ordinary re-  
tractors and with the patient in an indifferent  
spread-legged position. Theoretically all that is  
required is to hug the anterior surface of the rec-  
tum to the base of the gland, and any clever sur-  
geon with a finger in the rectum as a guide and a  
pair of dissecting scissors should be able to do this.  
Large metal guides have even been proposed to be  
inserted rectally to facilitate the procedure by  
leaving two hands free for it. But this attitude  
toward the operation is entirely wrong. Forget  
the rectum. If you do an anatomical dissection of  
the *perineum*, and don't just mess things up, to  
reach the prostate you can forget it; and less than  
once in a hundred will you have to stick in a finger  
for help. A good exposure secured by position,  
incision, and retraction is essential to good surgery

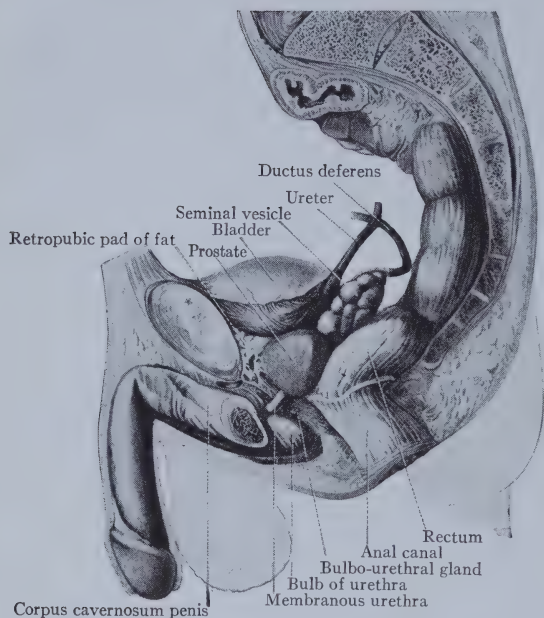


Fig. 1. The relation of the normal prostate to the neck of the bladder with the internal sphincter and to the triangular ligament with the membranous urethra and external sphincter and also the intimate relationship of the flexura perinealis recti to the posterior prostatic surface. (Reproduced from Piersol's *Human Anatomy*, 5th ed., Fig. 1662.)

any place, and a good exposure of the prostate is not secured by simply following the rectum down to it, even though this actually is what you do.

The prostate lies between the neck of the bladder with the internal sphincter and the triangular



Fig. 2. Illustrates the marked elongation of the urethra with hyperplasia. The verumontanum ejaculatory ducts are crowded into the rectal fossa mucous surface of the prostatic urethra is markedly increased. The hyperplasia projects intravesically into the internal sphincter, dilating it, but there is no disturbance of the external sphincter which lies in the triangular ligament at the position penetrated by the line marked c (Young's *Urology*, vol. 1, Fig. 239.)

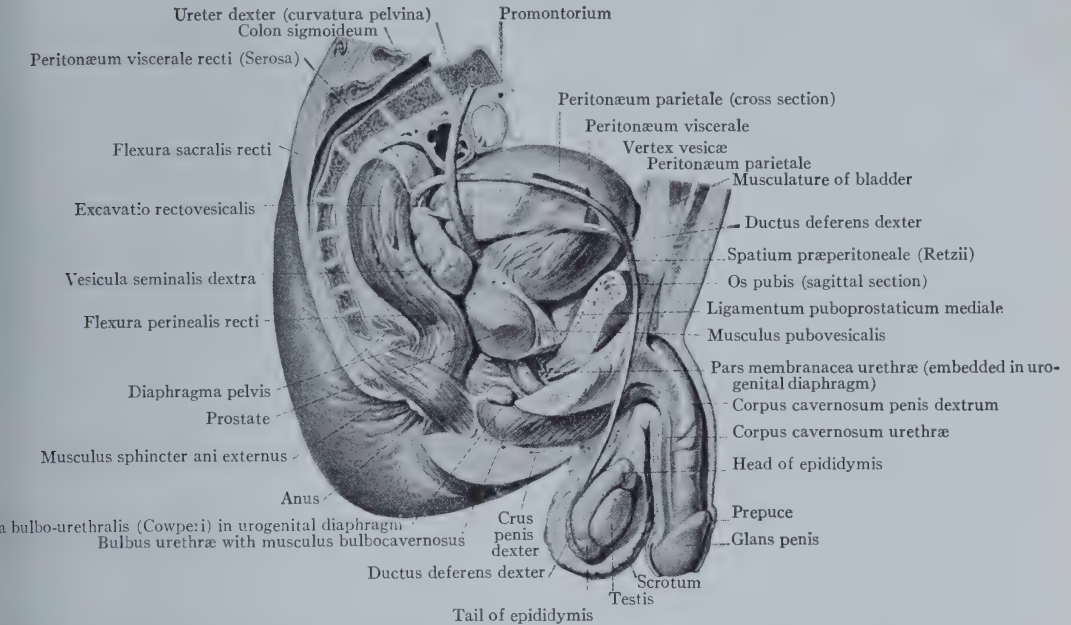
ligament with the external sphincter (1). Enlargements project intravesically inside the internal sphincter but never inside the external sphincter, though it may be pushed outward (2 and 3). The rectum passes obliquely for the pelvis to the posterior surface of the prostate and then turns backward by the "Flexura perinealis recti," to follow the curve of the sacrum (Fig. 4). Freeing the rectum and straightening this perineal flexure exposes the prostate. Familiarity with the position, interrelationships, and function of certain perineal structures make the operation possible and insures successful perineal prostatectomy. But it must be emphasized that not all the human body shows greater variability in the position of some of these perineal muscles, so that each operation to a certain extent demands an individual dissection of that individual perineum.

The central point of the perineum, immediately behind the bulb and about an inch above the anus is the initial sign post of the operation. It is sometimes by a fibrous septum, at others by a direct fusion, that the external anal sphincter, the two transversus perinei, and the bulbospongiosus muscles meet (Fig. 5). Division of the attachment of the musculus sphincter ani externus at this point is the first step toward freeing the rectum. By this division the anal muscles (1)



Fig. 3. Another view of a median lobe hyperplasia projecting intravesically inside the internal sphincter. (From Young's *Urology*, vol. 1, Fig. 19.)





4. Diagrammatic representation of the relations of the genital and rectal structures, showing how the rectum at the curve of the sacrum and the genital structures lie snugly against it above. By straightening the bend in the rectum at the flexura perinealis recti plenty of room for prostatic enucleation is secured. (From Braus: *Anatomie des Menschen*, 2d Bd., 1924, Fig. 211.)

levator, and coccygeus) and the genito-urinary muscles (transversus perinei, ischiocavernosus, bulbocavernosus, and constrictor urethræ) are visible into an anterior (genito-urinary) and posterior (anal) layer. The posterior layer forms the pelvic diaphragm (Fig. 6), but the levator concerns the operator. "The levator ani is a fleshy layer which extends from the anterior lateral parts of the pelvic wall downward and outward to the middle line, and forms, together with its fellow of the opposite side, a muscular floor to the greater part of the pelvic cavity. It originates from the pelvic surface of the body of the pubis by thin tendinous fibers, placed between the levator and rectovesical fascia, from the lesser sciatic foramen, and to a slight extent from the sacral spine. Some fasciculi are also frequently directed to the forepart of the muscle from the upper layer of the deep perineal fascia. The hinder fibers pass downward and inward to the lateral margin of the coccyx; the foremost ones run almost directly backward to the central point of the coccyx; and the intervening ones descend with increasing degrees of obliquity to the lower end of the rectum and to a narrow median aponeurosis between the muscles of the two sides between the coccyx and the anus.

"The levator ani is divided by a cleft beginning just below the obturator canal into two portions, only the anterior of which is directly connected with the rectum. This portion (the pubo-coccygeus of Savage) includes the fibers springing from the pubis and the adjoining part of the fascial origin, and is to some extent bilaminar: its outer or superficial fibers run backward over the side of the prostate and rectum, being closely applied to the highest bundles of the external (anal) sphincter, of which they seem to form a continuation upward, and becoming united with the corresponding part of the opposite side behind the bowel are inserted into the tip of the coccyx. The inner or deep fibers are partly inserted into the wall of the rectum, making their way between the external and internal (anal) sphincters to join the longitudinal fibers of the bowel; but a few anterior ones meet and decussate with those of the opposite muscle in front of the anus, and the posterior fibers similarly join with those of the other side to be attached to the front of the coccyx."<sup>1</sup>

Those fibers that form a continuation of the highest bundles of the external anal sphincter with those that sometimes are joined to the forepart of the levator muscle from the upper layer of the deep perineal fascia are frequently well developed, thus uniting the rectum more or less securely to

<sup>1</sup>Quain's *Anatomy*, vol. ii, Part 2, page 343, 1899.



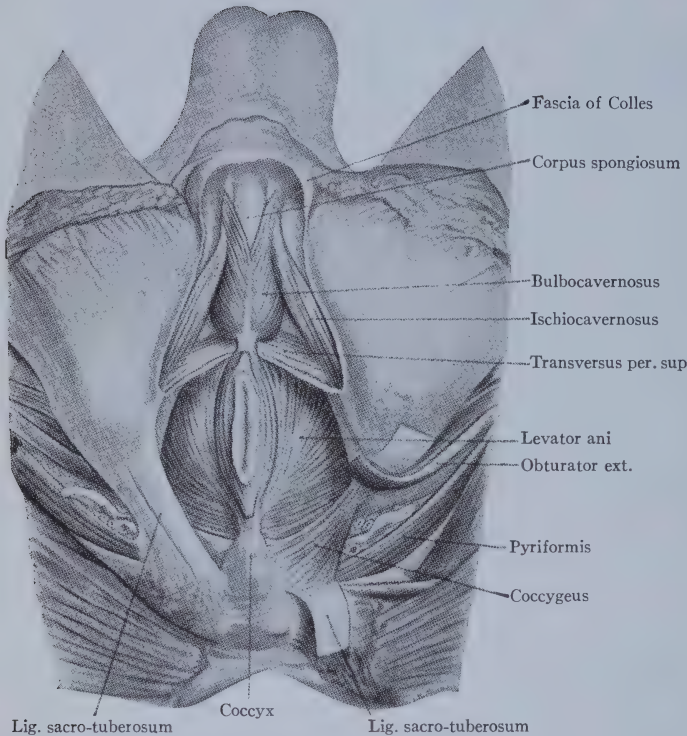


Fig. 5. Drawing illustrating the central point of the perineum and the structures attaching at this point, namely the bulbocavernosus, transversus perinei, the musculus sphincter externus, and levator ani. Division just below this point is the first step toward separating the anal layer of muscles from the genito-urinary layer of muscles. (From Quain's *Anatomy*, vol. iv, pt. 2, 1923, Fig. 72.)

the anterior or genito-urinary layer of muscles, and are usually designated as the recto-urethralis muscle. They are quite variable but when prominent their clean-cut division with scalpel is necessary to freeing the rectum at this second step of the dissection. When few and weak, blunt finger dissection may easily free the rectum to the apex of the prostate, but such blunt dissection must never be forceful as a wrong line of cleavage may lead directly into the rectum. It is well to realize that the sides of the rectum are less vulnerable than the mid-surface anteriorly to which the attachments of the genito-urinary structures run. As little disturbance of these as possible is desired; therefore, one often can work to advantage from the sides toward the middle. Gentle pressure on the anterior rectal surface externally with the index finger puts these levator ani fibers that run anteriorly to fuse with the genito-urinary layer of muscles on the stretch almost as effectively as an anterior retractor. Anterior retraction, when used, should never be forceful as it may injure the con-

strictor urethrae. Division of the recto-urethralis fibers brings the section to the apex of the prostate and the beginning of the backward bend of the rectum (Fig. 4). Rectum and prostate are here in close apposition as is so evident on finger palpation per rectum, but are separated by a transverse fascial sheath, a part of the rectovesical layer (Fig. 7), known to urologists as that of Denonvillier, that is attached to the angular ligament at the apex of the prostate and spreads out fanwise over the prostate and seminal vesicles to unite above with the peritoneum that is pushed down between the bladder and rectum. This fascia of Denonvillier is the second important sign post of the operation, as incision of it at

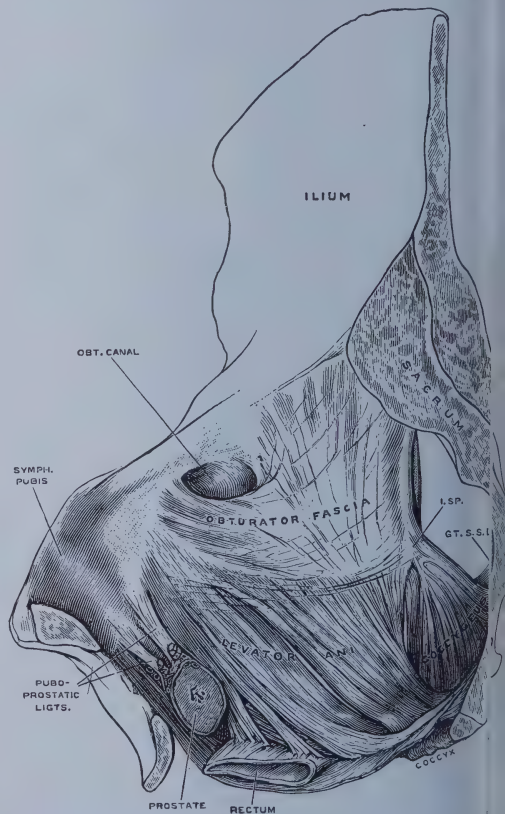


Fig. 6. Diagrammatic representation of the levator ani and coccygeus muscles. The few fibers of the levator ani attached to the anterior rectal surface are illustrated, coursing just behind the prostate. (From Quain's *Anatomy*, vol. iv, pt. 2, 1923, Fig. 71.)

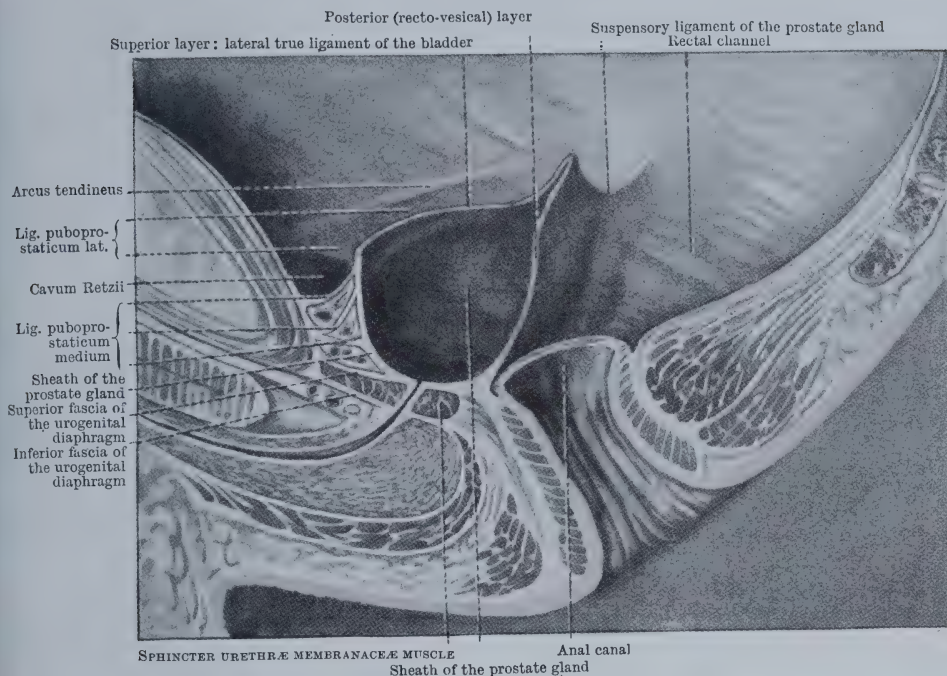


Fig. 7. A more or less diagrammatic representation of the fascial coverings of the prostate, which shows the posterior (rectovesical) layer generally called the fascia of Denonvillier, the splitting of which enables separation of the rectum from the prostate. (Cunningham's *Anatomy*, 4th ed., 1913, Fig. 435.)

er line of cleavage permits a quick, easy, and separation of rectum and prostate, which tightens the flexura perinealis recti and fully exposes the whole posterior prostatic surface.

the trail Young blazed so thoroughly by these sign posts—the central point of the perineum in Denonvillier's fascia—is traveled in his footsteps by most surgeons, although one minor short proposed by John T. Geraghty and the writer about the same time, is now recognized as safe. The steps with comments from personal experience will be presented but briefly as they are fully turned and profusely illustrated in many textbooks and recent surgical magazines.

The position of the patient may be a not inconceivable help in the dissection of a difficult perineum. I still use Halsted's perineal board and place the patient on it with legs so flexed that the perineum is almost parallel with the floor (Fig. 8). For the last 8 years I have been passing Young's seminal vesicle tractor (Fig. 9) or Geraghty's tractor (Fig. 10) into the deep urethra, where it is closed by an assistant, in place of a urethral rod. Later it can be slipped through into the bladder, the blades opened, and then used as a tractor to lift the prostate up in the perineal field (Fig. 11).

The incision of the perineum can be too high and it can be too low. It can also be too small. It starts on a level with the anus just inside the ischial tuberosity, arches up across the raphé one and one-half inches above, and ends at a corresponding point on the opposite side (Figs. 12 and 13).

The ischiorectal fossa on each side is opened up between transversus perinei, levator ani, and rectum by blunt left index finger dissection against the scalpel handle in the right hand (Figs. 5 and 14), and Young's posterior bifid tractor is inserted. The conjoined tendon of the anal sphincter is divided (Fig. 15), thus exposing the attachment of levator ani fibers to rectum and the genito-urinary layer of muscles (Figs. 16 and 20). These rectogenital and recto-urethral fibers are next divided, exposing the apex of the prostate. It is important that this dissection does not injure the transversus perinei which carry important nerves and blood vessels to the structures between the triangular ligaments including the constrictor urethrae (Fig. 18). The seminal vesicle tractor is pushed into the bladder and opened. By traction and gently prying against the symphysis with its shaft the prostate is lifted by the open blades into the field but against the rectum. The rectum is



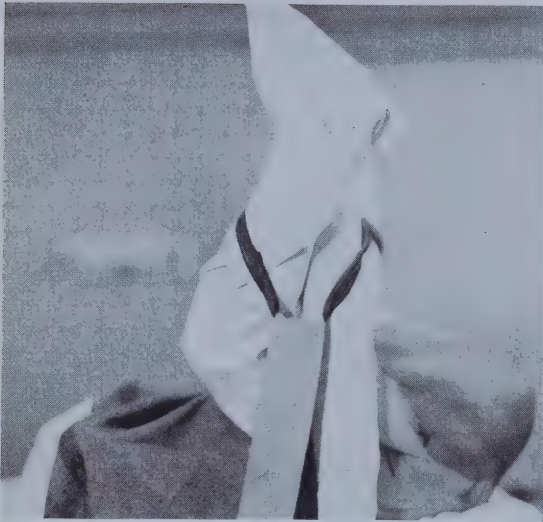


Fig. 8. Photograph illustrating the extreme lithotomy position used for perineal prostatectomy. It is seen that the perineum is almost parallel with the floor.

still between the examining finger in the perineum and prostate which nevertheless is distinctly palpable. By blunt and scalpel dissection at one or the other side of the prostate and away from the rectum, the proper line of cleavage on Denonvillier's fascia is found and followed across the middle to the other side freeing the rectum from the prostate (Fig. 17). Often an anterior tractor to lift the bulb and put the triangular ligament on the stretch is not required. Where the prostate and rectum are particularly adherent, freeing them in the mid part is not necessary as the incision of the posterior lobe can curve across the apex of the gland from one side to the other and the adherent rectum will drop out of the way attached to this flap of the posterior lobe. The membranous urethra has been neither denuded nor disturbed by the above procedure. The prostate has been exposed similarly to perineal exposure of the seminal vesicles in the operation of seminal vesiculectomy (Fig. 11).

The important steps to secure good exposure for perineal prostatectomy, therefore, are (1) position of the patient, (2) incision of the perineum, (3) freeing of the rectum to the apex of the prostate by separation of the genito-urinary and anal layers of perineal muscles, (4) lifting the prostate by an instrument *per urethram* into the field, and (5) exposing its whole posterior surface in the line of cleavage of Denonvillier's fascia.

**Enucleation.** Six of the seven portions or lobes of the prostate may undergo hyperplastic changes,



Fig. 9 (left). Photograph of Young's seminal vesicle tractor which is passed closed into the urethra in place of a sound and then can be pushed on into the bladder until the apex of the prostate has been reached in the perineal dissection, and when opened (Fig. 11) the prostate can be lifted well up into the operative field, to facilitate the separation of the rectum on the line of Denonvillier's fascia.

Fig. 10. Photograph of Geraghty's prostatic tractor. In some instances with the patient in extreme lithotomy position the straight tractor cannot be easily inserted. In such cases, Geraghty's tractor, which has a urethral curve, is substituted.

the posterior lobe alone being immune. The common types are various combinations of lateral, middle, and anterior lobes. Rarely do subcapsular or subtrigonal enlargements occur. Most urologists prefer to make a cystoscopic study before prostatectomy, but this study becomes a necessity before removal perineally, for it is of considerable importance to have diagnosed cystoscopically a particular combination requiring removal as early as possible complications, such as vesical stones and diverticulum (Fig. 19). There are several incisions of choice of the posterior lobe for purposes of enucleation. Young's original contribution was a designated conservative because he preserved only the external sphincter, commonly injured in so-called median perineal prostatectomy, but saving the ejaculatory ducts to which previously no attention had been paid. This latter was accomplished by making lateral incisions and thus preserving the ducts and verumontanum in the bridge of tissue between (Fig. 21). By this method the various lobe enlargements are enucleated separately. It is ideal for bilateral hyperplasia. When lobes are confluent or ring type complete enucleation is sometimes difficult, smaller nodules being easily overlooked, or when the enlargements are of size they must be removed in pieces, thus endangering the completeness of the procedure. Otherwise the middle bridge will be torn and mutilated. This is no great disaster, but in most cases cleaner, more complete enucleation is facilitated by the inverted V incision (Fig. 22) which also preserves the verumontanum and ducts through which, in addition, a good open exposure of the

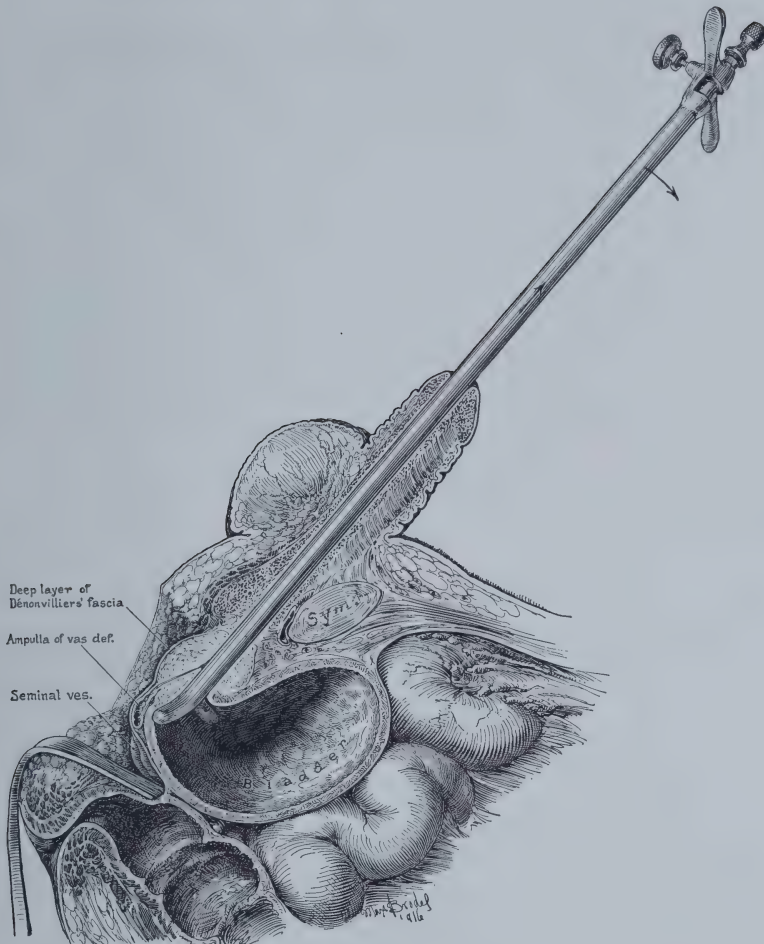


Fig. 11. A drawing that illustrates how the vesical tractor, by prying against the symphysis, lifts the prostate well up into the operative field. (From Young's *Urology*, vol. ii, Fig. 883.)

elastic portions of the gland is secured, which the entire mass can be shelled out under the direct control of eye and hand (Fig. 1, frontispiece). The particular precautions at this stage are complete removal with preservation of the ejaculatory ducts and internal urethra. The ejaculatory duct idea perhaps is overdone in most cases. Particularly important is it in those old men on whom economies have been done. But in younger men not thus protected against epididymitis whom restoration of the tract to as near as possible is desired, the preservation of the mountanum with its ducts is of considerable importance. This very precaution also minimizes the danger of postoperative epididymitis. Preservation of the internal sphincter is easily

accomplished by stripping it back with finger or dissecting scissors as the hyperplastic mass is freed and delivered. The advantages of the open flap method are better exposure and *en masse* enucleation. The redundant layers of mucosa of prostatic urethra and bladder neck left denuded by the enucleation can be trimmed cleanly with the bladder neck so that no obstructing or irritating tags are left. Visual inspection of the cavity and the neck is improved for cleaning it as well as ligation of bleeding points. It is well to attach one or more clamps to the rim of vesical mucosa that is formed by the division of the mucosal funnel in the final step of detachment of the hyperplastic mass, to prevent its being pushed back into the bladder later and then being the source of vesical hæmorrhage that is hard to control or, even





Fig. 12.

Fig. 12. Photograph of incision of perineum. The fingers of the operator rest just inside the ischial tuberosity from and to which the curved incision goes (Fig. 13).



Fig. 13.

Fig. 13. Photograph of incision of perineum curved across from ischial tuberosity to ischial tuberosity.



Fig. 14.

Fig. 14. Photograph of the method of blunt finger section into the left ischio-rectal fossa, the route of the finger being illustrated diagrammatically in Fig. 14. The finger must enter the space just below (dorsal) to the transversus perinei, never above (anterior).



Fig. 15.

Fig. 15. Photograph illustrating the first step toward separation of anal and genito-urinary muscle layers by the division of the conjoined tendon of the anal sphincter. The blades of the bifid tractor are shown passing into the ischio-rectal fossæ above the rectum on each side of this conjoined tendon.



Fig. 16.

Fig. 16. Photograph of a still deeper dissection than shown in Figure 20. The seminal vesicle tractor can be palpated through these fibers that have been placed on the

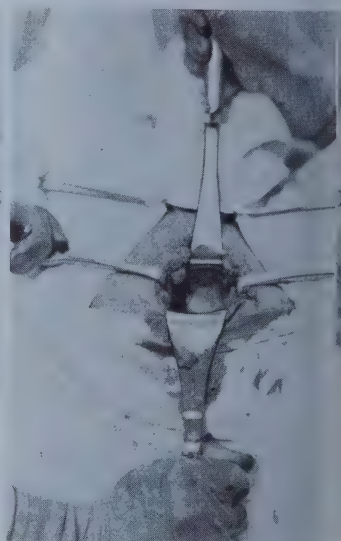


Fig. 17.

stretch by the two tractors. Dissection still follows rectum as closely as possible.

Fig. 17. Photograph showing the posterior surface from which the rectum has been separated on a line of cleavage of the fascia of Denonvillier and which is held well up in the perineum by the seminal vesicle tractor that has been inserted into the bladder and opened the membranous urethra with its external sphincter has been denuded nor disturbed.

when slight, produces clots that plug the catheters and trouble postoperative care. A possible disadvantage is predisposition to stricture in the

course of restoration of the prostatic urethra in much as the whole of the prostatic urethra is moved with the periurethral hyperplasia. co

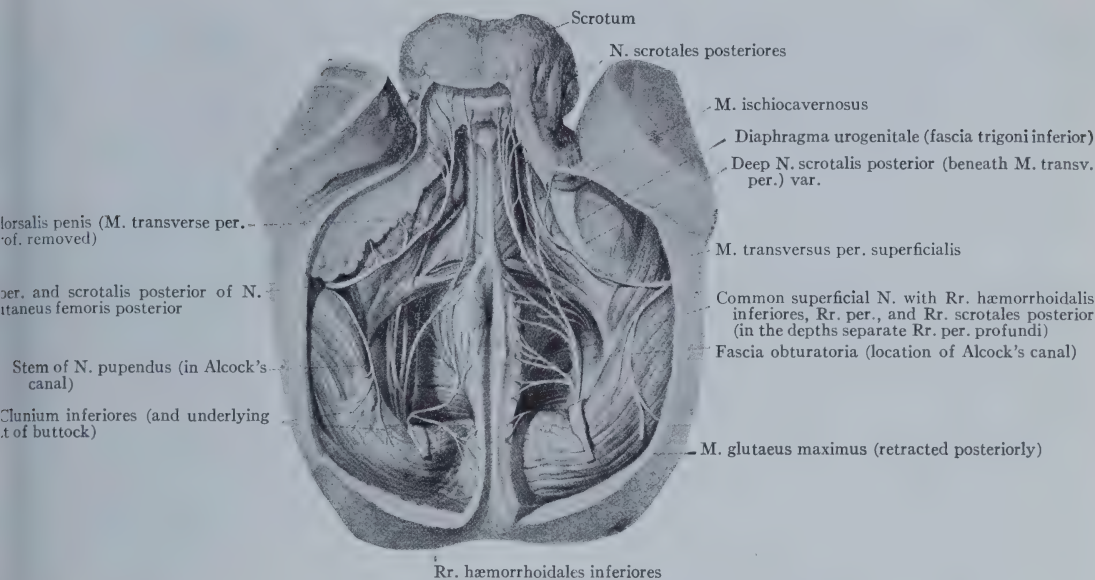


Fig. 18. A drawing that illustrates the importance of not injuring fibers and vessels that pass along the transversus perinei to the genito-urinary layer of muscles and also the importance of hugging the rectal wall in the dissection of the prostate. (From Braus, *Anatomie des Menschen*, vol. ii, 1924, Fig. 243.)

resection at the neck is not uncommon after suprapubic enucleation by which the prostatic urethra is likewise divulsed. The writer has seen many such postoperative suprapubic cases but only one of his own perineal cases does he know of with stricture. This was a patient with a small urethral hyperplasia in whom the urethral catheter came out on the second day and urination was established so satisfactorily that it was never replaced. As a routine the urethral catheter, retained at operation as a guide to the reformation of a prostatic urethra upon the same principles as after external urethrotomy, is retained 6 to 7 days. During this time gentle suction is used so as to keep the perineum dry, and quick healing is the rule.

The important steps of enucleation are (1) incision of the posterior lobe, bilaterally, if the hyperplasia is small and two-lobed, otherwise by an inverted curve; (2) preservation of verumontanum and ejaculatory ducts in patients not prostatectomized; (3) replacement of the urethral retractor by the short prostatic tractor, passed into the bladder through the prostatic urethra opened by one of the lateral incisions or by the curved incision, so as to give more direct traction (Figs. 23 and 24, frontispiece); (4) complete clean removal of all the hyperplasia; (5) preservation of the external sphincter; and (6) treatment of the redundant prostatic and vesical mucosa so as to leave no tags or bleeding points.

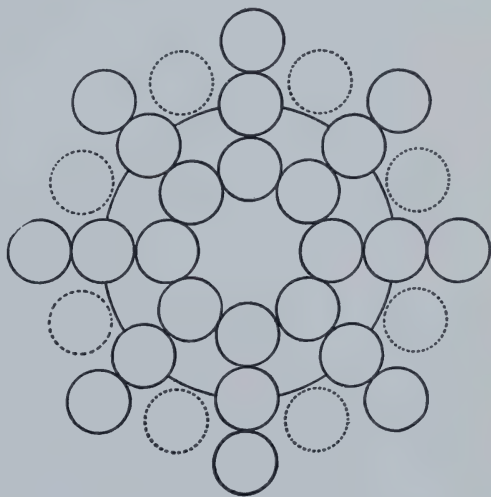


Fig. 19. Chart in use for recording findings at the time of cystoscopy and by which the exact type of hyperplasia may be indicated. The three circular rows of eight views are for the near, mid, and far positions of the cystoscope with respect to each, the views of course often changing markedly according to whether the cystoscope is elevated so as to bring the vesical neck near the field or whether it is depressed so as to bring it at some distance away. By this sort of manipulation the position of the shaft in the right or left sulcus of the middle lobe can readily be demonstrated. The dotted circles are for the purpose of recording changes of view for any one position with such manipulation. (See Hinman: Chart for recording cystoscopic examinations. *J. Urol.*, 1918, ii, 433-444.)





Fig. 20. Photograph illustrating the muscle attachments of the rectum to the genito-urinary layer of muscles placed on the stretch by the posterior and anterior tractors. These muscle attachments are divided by the scalpel as closely as possible to the rectal wall so as to avoid injuring the important nerves and blood vessels that pass to the central point of the perineum in the transversus perinei muscles and their fascia (Fig. 18). The central point of the perineum is held in the tissue forceps and it is seen that the transversus perinei in the illustration are a little asymmetrical.

*Repair with hæmostasis.* The restoration of a good urethra with complete continence is secured only when exposure and enucleation have been done successfully. But the surgical danger of prostatectomy is hæmorrhage and methods to control this necessarily influence the processes of repair. Undoubtedly those cases which do not bleed heal best. Often bleeding points can be seen and ligated but it is rarely safe to rely on this alone, for hæmostasis and the wisdom of taking 20 to 30 minutes more to do this and then have to pack probably is questionable. I am by no means so optimistic as one of my recent associates who recommends this as a possible successful routine of the future.<sup>1</sup> Most cases require either packing or hæmostatic bag or both. In order to disturb repair as little as possible the bag can be small and the packing largely one of outside infra-

<sup>1</sup>Gibson, Thomas E. Improvements in perineal prostatectomy permitting primary wound closure and healing without drainage. *Surg., Gynec. & Obst.*, 1928, xlvii, 531-539.

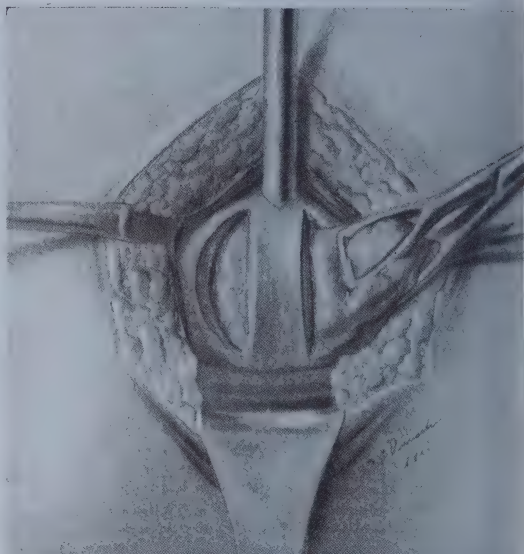


Fig. 21. A drawing that illustrates the method of bilateral enucleation by Young's original method which preserved the bridge of prostatic tissue carrying the ejaculatory ducts. (From Young's *Urology*, vol. ii, P. 806.)

prostatic compression against this bag. The most troublesome place of hæmorrhage is that from the neck, which is hard to control by packing and which fills the bladder with clots. All points of bleeding at the neck that can be located should be ligated by suture. This accomplished within a reasonable period, the urethral catheter, above referred to, is placed, the inverted V flap of the posterior lobe sutured in place by two or three mattress sutures, and the perineum closed. An infraprostatic pack may be placed for compression of the prostate and obliteration of the cavity of enucleation. Where bleeding cannot be controlled by suture and ligature, as is usual with enlargements of size, a special mushroom catheter made by Eynard<sup>2</sup> is passed through the perineum on a special stylet into the bladder (Figs. 25 and 26).<sup>3</sup> Traction on it will compress the neck and the prostatic cavity can be lightly packed against it to control bleeding, or, as in most cases, an infraprostatic pack can be placed outside of the prostate for compression. As material for packing I prefer the gauze-protective ribbon (strip of gauze sewn between two layers of protective tissue, Fig. 27) of Charnock<sup>4</sup> because its removal is less painful and it is less apt to stir up hæmorrhage by not being adherent.

<sup>2</sup>For Bard and Company of New York.

<sup>3</sup>This type of bag, which can be obliterated by stylet for removal, is preferred to the very efficient one of Davis because of size only.

<sup>4</sup>Charnock, Donald A. A non-elastic rubber strip drain. *J. Am. Med. Ass.*, 1929, xcii, 982-983.

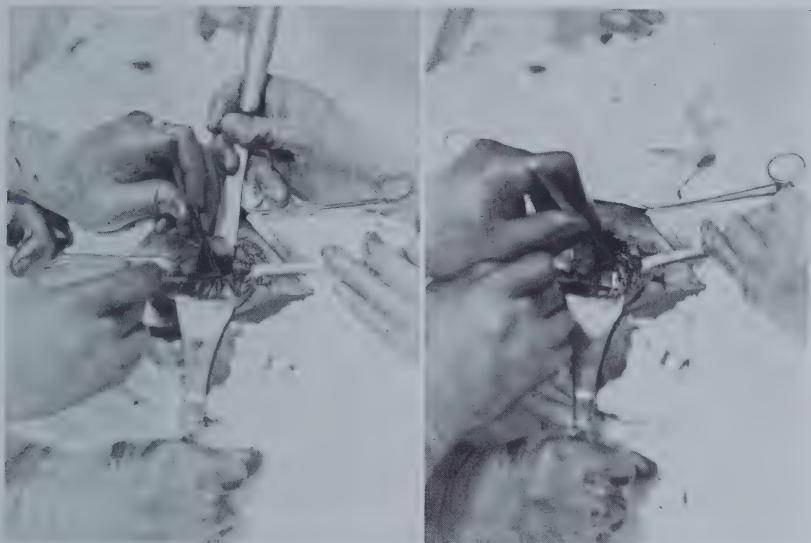


Fig. 22 (left). Photograph of V-shaped incision of the posterior lobe of the prostate which also leaves a bridge of tissue carrying the ejaculatory ducts so that they can be preserved and which has the added advantage that a wide open exposure of the hyperplastic portions to be enucleated is secured. Tissue forceps are seen to grasp the apex of this V bridge and the scalpel points to the hyperplasia bulging through the incision.

Fig. 23. Photograph taken with the V bridge held posteriorly so as to expose the seminal vesicle tractor in the prostatic urethra. At this stage this tractor is withdrawn and the short prostatic tractor of Young inserted so as to give more direct and better control of traction for enucleation.

important steps of repair are (1) control of hemorrhage by suture or ligature, (2) urethral catheter, (3) special perineal catheter compressing the neck so placed that the remnant mucosa is not everted, (4) small proctitic (gauze-protective) pack, only when necessary, (5) suture of V flap of posterior lobe incision in place, on both sides if no bleeding and neither proctitic pack used, on one side with tube and gauze at other when used, (6) infraproctitic pack when indicated, and (7) closure of perineum.

#### TEACHING OF PERINEAL PROSTATECTOMY

Theoretically the perineal route has many points of superiority over the suprapubic but it never has been popular because of the difficulties of technique. It used to be said the one is hard on the doctor but easy on the patient whereas the other is easy on the doctor but hard on the patient. The distressing evidences of failure for the perineal route persist in attempts to master the details of the technique when another route that is easy and as effective as kills or cures is at hand. No longer is there any difference in mortality to stimulate more men to make the effort. With few exceptions the men trained by Young and those trained

by them are the practitioners of perineal prostatectomy. There can be no question but that suprapubic prostatectomy is superior to median perineal prostatectomy still practiced in many foreign clinics and the literature has been unfair to Young's operation because of comparisons based on this operation. Before 1903 there were only three American and eight foreign references to perineal prostatectomy (*Index Medicus*); from 1903 to 1915 there were 145 articles published by foreigners to 98 by men in the United States; whereas during the last 12 years there have been 66 American publications as compared to only 22 foreign and many of these latter were reports on a few cases, no large series. This is evidence that the operation is now relatively unpopular abroad. The reason would seem to be the fact that Young's operation is the only one that equals or better the after results of suprapubic removal, and Young's methods have not been followed. A glance at the American articles of recent years shows numerous modifications (by Cecil, Crowell, Davis, Dillon, Geraghty, Hinman, Lowsley, Lydston, Morrissey, Ochsner, Gibson, and Young) endeavoring to simplify the technique, make it safe from rectal or sphincteric injury, and improve certain surgical principles such as hæmostasis. In



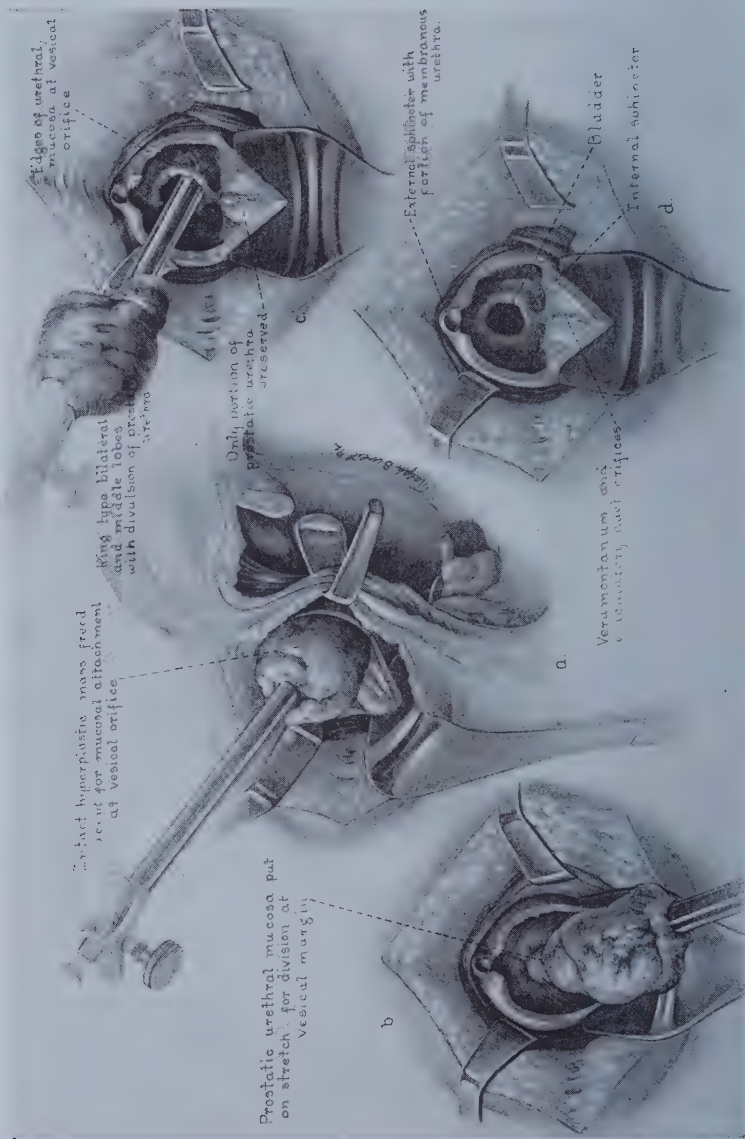


Fig. 24. Drawings to illustrate the *en masse* enucleation of a prostatic hyperplasia by way of the perineum.

Fig. 25. Photograph of special mushroom catheter for use and for traction against the vesical neck to confining. The stylet is shown with a small wire eye and which is threaded on to the suture that passes through the lumen of the catheter from its tip so as to guide the stylet securely into the end of the catheter for removal (Fig. 26).

ness to the originator, most of these modifications of Young's classical method are of minor importance and in fact many of them had been previously used or tried out by him independently. If these objects are attained, perineal prostatectomy will continue to rival the suprapubic operation, but probably never will replace it. Its popularity would have to grow considerably for it to happen. The necessary apprenticeship beyond the reach of the majority is a factor in its value that must be recognized. Rarely has a specialist been self-taught. The life of perineal prostatectomy depends on inbreeding. And yet a perinealist must win his spurs by individual effort. Spoon feeding won't work. In addition it must be recognized that with improvements in preparation and after-care the suprapubic route may become a much more benign operation than it was 20 years ago. When performed by the same method and with proper attention to hæmorrhage it becomes a worthy opponent of its more radical rival. But judging by published statistics the perineal route has held and still holds the lead in malignancy, the relative figures being about as follows. In other words, the perineal route will save about three men in every hundred that would be lost suprapubically in the hands of those most experienced with each method. Taken at large the difference would be as about 5 to 15, but no doubt



Fig. 27. Photograph illustrating the type of protective ribbon used for packing.



Fig. 26. The stylet has been inserted so as to eliminate almost completely the bulb part of the catheter.

many of the 10 survivors of perineal surgery done by the casual operator would rather be dead. Perineal prostatectomy is not to be attempted lightly. In spite of the higher mortality, the suprapubic is the operation for the occasional operator.

This difference in surgical risk alone is worth an effort and explains the persistence of a few surgeons in taking the perineal risks of after trouble that could be largely avoided by going suprapubically. But it must be understood in all fairness to the subject under discussion that functional results suprapubically are by no means one hundred per cent perfect. Far from it. The problems of complete enucleation and of repair with hæmostasis are just the same, only with this difference—the perinealist has the advantage of better exposure and more direct access to meet them. If certain of non-injury to the rectum and constrictor urethræ all urologists no doubt would at once become perinealists.

The big question of interest to all, therefore, is whether the principles of preserving the rectum and the urethral sphincter can be taught and handed down from generation to generation, since this is the only way perineal prostatectomy will survive. That the first generation has carried on successfully is proved by the medical literature of recent years, remarkably low mortalities of good sized series being reported by some of Young's pupils. To test the second generation in a small way a questionnaire was mailed to the small group of men now practicing urology who have had their training under me. Their answers have been summarized elsewhere.<sup>1</sup> As further evidence of the practicability of training these men the results

<sup>1</sup>The Teaching of Perineal Prostatectomy. California State Medical Meeting, May 7, 1929.

of prostatectomy operations performed by 14 of them at the City and County Hospital while in training have been studied. Each one served at least 6 months as chief of this service after 2 or more years apprenticeship as an assistant, and each one performed from 2 to 11 perineal prostatectomies. The results of 70 operations by these 14 men are presented in combination with their answers. It may be said here that all of these men but one prefer the perineal route.

## REFERENCES

- CECIL, A. B. New technic for performing perineal prostatectomy. *J. Am. M. Ass.*, 1922, lxxix, 1661-1664.
- CROWELL, A. J. A modification of Young's perineal prostatectomy. *South. M. J.*, 1922, xv, 45-49.
- DAVIS, E. Perineal prostatectomy with particular reference to sacral anesthesia and to hemostasis. *J. Am. M. Ass.*, 1924, lxxxiii, 1988-1993.
- DAVIS, E. Distensible bag for hemostasis and drainage following perineal prostatectomy. *J. Urol.*, 1927, xviii, 201-210.
- DILLON, J. R. Perineal prostatectomy by a modified technic. *J. Am. M. Ass.*, 1924, lxxxii, 287-291.
- GERAGHTY, J. T. A new method of perineal prostatectomy which insures more perfect functional results. *J. Am. M. Ass.*, 1922, vii, 339-345.
- GIBSON, T. E. Improvements in perineal prostatectomy permitting primary wound closure and healing without drainage. *Surg., Gynec. & Obst.*, October, 1928, 531-539.
- HINMAN, F. Structural results of prostatectomy reference to methods of enucleation, based on a study of 136 cases. *Arch. Surg.*, 1922, iv, 154-174.
- LOWESLEY, O. S. Enlargement of prostate (two-stage perineal prostatectomy). *Surg. Clin. North Am.*, 1925, v, 281-285, 288-292.
- LYDSTON, G. F. Tractor for perineal prostatectomy; new perineal drainage tube. *Surg., Gynec. & Obst.*, 1916, xxiii, 742-743.
- McKILLOP, L. M. An improvement in the technic of perineal capsuloprostatectomy. *Med. J. Australia*, 1927, i, 48.
- MORRISSEY, J. H. New technique for perineal prostatectomy with preservation of external sphincter. *Surg., Gynec. & Obst.*, 1927, xlv, 671-675.
- OCHSNER, A. J. Prostatectomy combining the advantages of the suprapubic and perineal methods usually employed. *Surg., Gynec. & Obst.*, 1919, xxix, 84-96.
- YOUNG, H. H. *Practice of Urology*. Philadelphia: W. B. Saunders Co., 1926.







# General Aspects In Pyorrhea Research

---

BY HERMANN BECKS, DR. MED. ET MED. DENT.,

\*Stomatological Research Group and George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco, California.

---

The extraordinarily discouraging results in the treatment of pyorrhea in Europe a few years ago led to a renewed investigation of the anatomical foundations of the peridental tissue. It has been the custom in general medicine, if, in spite of long-continued research in the etiology of a disease, no explanation is found, to conclude that the basic principles were wrong. Moreover, the histological investigations of *Weski*, *Häupl-Lang*, as well as *Gottlieb* and *Orban*, have shown that our conception of the dental system and surrounding tissues must undergo a further revision. This work has made a great advance since 1920, to be sure, but has not yet arrived at the main and long-sought goal, namely: an explanation of the etiology in *all* cases. The researches have enabled us, as we shall see later, to recognize, histologically, the cause of certain forms of disease entities related to the so-called pyorrhea. The work in Vienna especially has met with considerable opposition in Europe, particularly in Germany. This is probably due partly to the manner with which *Gottlieb* and *Orban* endeavored to force their theories in that part of the world. It is necessary, however, that their work undergo an extensive verification. Above all, we must determine whether their histological findings are in accord with those of the practitioner. The microscope alone cannot give us a knowledge of biological processes, for it only enables us to interpret the histological picture. Interpretations are, however, mainly subjective appearances. Controls, such as animal experiments and clinical experience, are necessary. Only when these three methods of investigation are united are we going to reach an acceptable biological explanation.

The different European and American classifications are, in general, scarcely satisfactory, mainly because these classifications are based on a partial knowledge of the subject. The changes in histological structure, not always noticeable in the clinical picture, may be the basis of

---

\*Conducted under grants made by the Carnegie Corporation, the Research Commission of the American Dental Association and the California State Dental Association.

the classification or it may be based on the more or less hypothetical assumptions of the authors as to the etiology of the types of the disease. If we consider further that it is not easy to provide the clinician with a systematic classification that is valuable in all his cases, which will guarantee him extensive and successful therapy, we ought not to forget also that clinical classifications from another source do not satisfy the scientist. It is immaterial to him that a pocket measured with the "periodontometer" is 2 or 4 mm. deep, or that the tooth shows a more or less extreme degree of loosening which may have resulted from different causes.

Thus, if we consider the difficulties which defy almost all attempts at classification, we are surprised at the frequency with which new names and definitions for the so-called "pyorrhea" appear in the literature, even before we have made a clear picture of the single factors which lead to its symptoms. The last few years of increased research in this special subject have resulted in nearly 350 theories of pyorrhea and an excessive nomenclature which has confused the clinical picture for the practitioner more and more.

I must emphasize the fact that the term "pyorrhea" is in no way satisfactory, because the term "pyorrhea" (pus discharge) indicates only a secondary or late symptom of the group of diseases characterized by many more important signs, therefore at present I can only provide a classification which will cover the majority of the demands from clinical and scientific sides. If the clinician and scientist co-operate in this attempt, it will lead to a solution satisfactory to both.

How has this difficulty been overcome in Europe? The solution has been mentioned occasionally in the American literature, without emphasizing sufficiently the advantages and disadvantages of the present European classification. This appears to me most important, since the work of the Vienna school unaccepted in Europe has, up to now, been disseminated exclusively here in America, and the equally valuable criticisms of other European dentists are not so well known. In order to amplify this somewhat one-sided picture, an extensive review of the literature of the last years in Europe on the histological phase of the question of pyorrhea has been added to this paper. Therefore, I shall, in the following pages attempt to describe the different disease types of the peridental tissue which are included under the term "pyorrhea," as we understand it today. This will conform in general to the views in Europe and will provide a better classification, as well as satisfy in some measure the clinician and scientist.

There are two different disease pictures, which must be separated, namely: "paradentitis," which is characterized by inflammatory proc-

## ORIGINAL ARTICLES

cesses, and "paradentosis," a disease of the "Paradentium" in which degenerative or retrogressive processes are foremost in the pathological activities and which are concealed by parodontitis in the later stage. On this basis the term "paradentosis" or "marginal paradentosis" (*Weski*) is generally used in Europe. The pus symptom has a secondary significance with regard to the treatment and its indications, a fact which is important for the practitioners, because in the case of paradentosis the treatment must be the same whether pus exists clinically or not.

What interests us here are the changes which take place in the tooth and periodontal tissues in "paradentitis" and "paradentosis." *Weski* deserves great credit for his term "Paradentium" (1921), under which he includes all locally and functionally related tissue complexes: gum, periodontal membrane, alveolar process and cementum, because the changes taking place here extend not only to the periodontal membrane and mucous membrane but to most all of the tissue.

The subjective symptoms of pyorrhea occurring in parodontitis and paradentosis are assumed to be known in general. In the following we will observe more closely their course according to the morphological picture on the basis of work of an histological nature:

### PARADENTITIS.

In the case of parodontitis (Figs. 1 and 2) there occurs, as a result of inflammation of the gum margin or a heavy layer of calculus or detritus, also through toxic irritants at the neck of the tooth, an accelerated detachment of the epithelium from the surface of the tooth. Since an atrophy of the inflamed gum margin cannot follow this detachment, pathological deepening of the pocket occurs. These existing gum pockets are favorable for the deposition of bacteria and food remnants and finally tartar forms in larger and larger quantities until the formation of subgingival tartar occurs. This increasing irritation incites the inflammatory processes. The small cell infiltration of the submucosa of the gum pocket increases, without secretion. Gradually the ulceration of the whole pocket and the formation of granulation tissue occur and pus is demonstrable in the pocket clinically.

As a result of deep epithelial growth, functional atrophy develops and as a result of the inflammatory processes, bone resorption occurs. The clinical picture shows an area of very red or livid blue gum and a very slow and increased loosening of the teeth. Since this unhygienic condition exists in patients who take little or no care of their mouths, or who have considerable calculus with much putrefaction, *Gottlieb* has termed this type of parodontitis "Schmutz-pyorrhoe" ("filth pyorrhea").



The second principal form of the early alveolar pyorrhea, or "paradentosis," in which the main symptom is degeneration, is related to

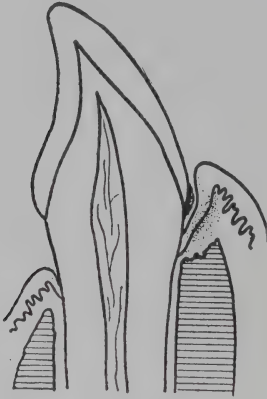


FIG. 1.

(Right side): Paradentitis: Pocket-formation as a result of inflammation of the gum-margin with calculus in the pocket, small cell-infiltration and lacunary resorption of bone in the area of inflammation.\*

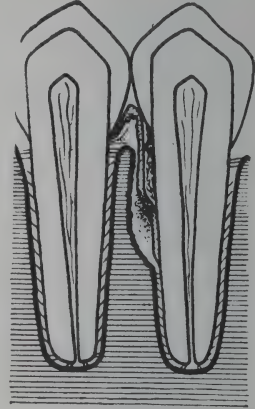


FIG. 2.

Paradentitis in an interdental space: "Gum-pocket" and "bone-pocket." Vertical atrophy can not turn into horizontal atrophy because the alveolar crest is still in functional connection with the neighbor tooth.

paradentitis only in so far as it results in the loss of the tooth, but it develops in an entirely different manner. In true cases, the inflammation is not actually present, no deep pockets with granulation tissue and pus exist, and there is thus no initial stage which might have been designated as alveolar pyorrhea.

We must therefore differentiate between four main clinical forms of "paradentosis" (Kantorowicz).

1. *The presenile atrophy of the alveolar process.* Physiologically, the loss of the tooth occurs in the senile period of individuals, since the deep epithelium grows slowly and the gum follows the shrunken bone uniformly, although the pocket may not exceed the normal depth of 1-1½ mm.; though it can, under certain constitutional conditions, which may be designated as presenile, appear at a time when there is

\*Illustrations taken from Kantorowicz: *Klinische Zahnheilkunde*. Verlag: Hermann Meusser, Berlin.

no question of the degeneration of the individual, as is found occasionally in young adults, where no cause can be designated. (Fig. 3).

One sees clinically an apparent increase in the length of the teeth.

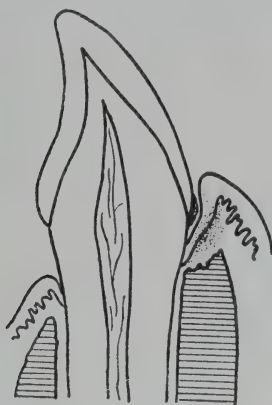


FIG. 3.

(Left side): Paradentosis in form of presenile atrophy. Equal atrophy of bone and the covering gum tissue, without inflammation or pocket formation.

In reality the gum is drawn back, the neck of the tooth is free and there is a triangular space below the contact point between the teeth.

The most important factor for the diagnosis is the uniform involution of the soft tissues *without pocket formation or inflammation*. *The gingiva cannot be lifted away, but is firmly attached to the tooth*. Though primarily a deep growth of epithelium ought to be assumed, there is observed an atrophy of the gum and alveolar process in keeping with the advance of the detachment.

2. *The second form is "over-pressure paradentosis."* We know that persistent pressure on a bone leads, with few exceptions, to bone atrophy, and in contrast, pulling leads to invigoration and redeposition of bone. As long as the tooth hangs elastically in its alveolus, the bone will react to the pull, and if this pulling reaction is turned into a pressure reaction, an occlusal trauma results. In fact, we see in such teeth a widening of the periodontal membrane at the point of pressure. When this acts in line with the tooth axis, the bone atrophy localizes at the tip of the tooth; if it occurs above at the border of the alveolus, this disappears and we encounter a "vertical atrophy" (*Weski*) and in the case of thin lamellae

(Fig. 4) a "horizontal atrophy" (*Weski*). The teeth become loosened, the raising action becomes stronger and the pain becomes progressive.

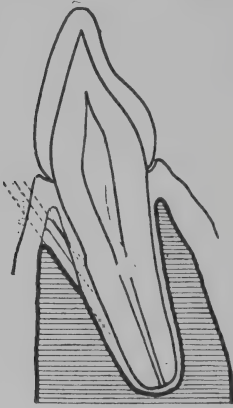


FIG. 4.  
On the labial side vertical atrophy changes into horizontal atrophy.

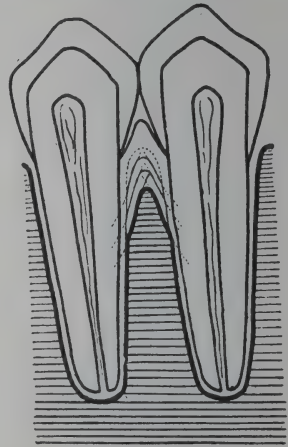


FIG. 5.  
In interdental spaces the vertical atrophy on both sides of the alveolar septum results in a horizontal atrophy.

It happens that in the cases of horizontal atrophy where we have a damaged tissue next to the epithelium, the epithelium proliferates deeply. Pockets form to produce "paradentitis," which accelerates the extrusion of the tooth caused by the toxic irritation. We have thus in the case of those teeth with occlusal trauma a so-called "alveolar pyorrhea" of the old type. We very seldom see true cases of occlusal trauma.

3. In contrast to the "pressure paradentosis" there is the third form of "*Paradentosis by lack of occlusion.*" The functional influences exerted on the bone by the teeth are missing and we find in teeth, which lack an antagonist, that the alveolar compacta resolves into functional atrophy. It does not stop at bone atrophy, but a simultaneous laying down of cementum and bone in the upper surface of the root sets in. The result is a lifting of the tooth out of the alveolus. The teeth thus lacking an antagonist grow into the space, which later causes paradentitis, especially at the point of bifurcation of the roots of the denuded teeth. The practice of supplying each tooth with an antagonist, if it shows signs of being forced out of the alveolus, is therefore correct.

4. As the last or fourth form of paradentosis, the "diffuse atrophy" (*Gottlieb*) of the alveolar process without local inflammatory irritants should be mentioned. This, according to *Gottlieb's* observations, appears after influenza and other infectious and exhaustive diseases. And even here there are resorption sinuses in the bone as well as cementum in which a cellular tissue is laid down. *Gottlieb* believes the primary cause

to be damage of the cementum. The peridental space is considerably enlarged, which may lead to horizontal atrophy of the alveolus at the neck of the tooth. The bone, however, disappears above and below the resorption sinus, so that a clinical loosening of the tooth is noticeable. Large marrow spaces appear in the center of the bone as a result of the atrophy of the spongiosum and a deep growth of epithelial tissue then occurs, mostly at the neck of the tooth (Fig. 6, left side) and leads to its elimination.



FIG. 6.  
Resorption sinuses in cementum.  
On the right side corresponding resorption of bone caused by functional atrophy. On the left side the resorption sinus is near the pocket epithelium which consequently grows over this defect.

As a result of the loosening of the tooth a secondary atrophy by occlusal trauma frequently follows, with pain and parodontitis. True cases are seldom seen. *Gottlieb* cites the tooth migration and space formation between the teeth as early symptoms. The front teeth in the upper jaw, more frequently than in the lower jaw, become fan-shaped and are considerably loosened by the bite pressure. The preliminary cause is still unknown. It is probably the pressure of the connective tissue occurring at the places where bone is resorbed. *Therefore, we never see pus discharge in the beginning of parodontosis, but only in the final stages. This fact must be considered on account of the different initial causes.*

These are the four basic forms of parodontosis which we must distinguish from parodontitis according to our present histological knowledge. That is, we can only determine the present stage of the disease without recognizing the causes which have led to these penetrating changes, at least in the case of presenile and diffuse atrophy.



With regard to the occurrence of the paradentosis by occlusal trauma and by lack of occlusion, we have at present sufficient clinical and histological investigations to explain satisfactorily, from an etiological point of view, both these forms of parodontal changes. We are ignorant, however, of the frequency with which these forms occur on a purely mechanical basis. Do they represent only a very small per cent or a major part (98 per cent) of all parodontoses? If so, we may consider the 2 per cent as negligible.

On the other hand, it appears to me that we should give the presenile and diffuse atrophies more attention. All the more so when we consider how little we know of their etiology. And that is also the reason why we cannot approve their inclusion in the preceding classification from a clinical standpoint. We have two forms with a known etiology and two forms without. That is, in two cases we are in a position to help therapeutically and in the two others we are not. And if it is actually proven that a greater percentage of all paradentosis has as its basis presenile or diffuse atrophy, which may be concealed in a later stage by parodontitis, we cannot clinically determine the cause unless the patient comes to us with the first complaint in the beginning. Therefore, our main purpose should be at the present time to discover the etiology of both principal forms. The quickest way is not simple, and I might say that it is only possible through the combination of clinical and laboratory research work.

The only studies of the disease must be undertaken from the clinical point of view before the picture of parodontitis is considered; in other words, the clinician must have an exact knowledge of these different forms of paradentosis and subject his patients to the most rigid clinico-medical examination. A statement might be made here as to the method by which the exhaustive research of these cases should be undertaken.

Histologically, as well as histopathologically, we have reached a finale. The unsettled questions still pending of the importance of certain tissue reactions are not of such decisive significance that they would lead to a solution of the problem of parodontoses (pyorrhea). It is quite apparent then that we must seek some other means by which to arrive at the etiology. The endeavor should be so directed that the causes of tissue changes examined histologically could be explained by experimental methods. On the other hand colloidal chemistry has in the last few years been of great service to pathology and especially to the interpretation of inflammation.

Today, the conceptions of enamel and cementum vitalism are inade-

## ORIGINAL ARTICLES

quate, as well as the physico-chemical relations of the tooth as a whole. In this connection, we cannot disregard the quantitative and qualitative analyses of the saliva under physiologic and pathologic conditions, which have been performed within the past few years. Such tests may serve as standards and starting points for experimental research. They will open up an extensive field and I am convinced that the answers to many of the questions of dental therapy may be found in the understanding of the composition and correlation of the body fluids and their changes under different conditions.

It is apparent that we must begin our investigation at this point with correct considerations to observe. The relations between the salivary juices and the dental system and its surrounding tissues have been emphasized recently and are more than ever uppermost in the attention of the dentist.

It is evident that the significance of osmosis or diffusion in the case of remineralization of the enamel should not be undervalued and this must further become apparent in the tooth or paradentium when the saliva is changed. Moreover the saliva, as a typical secretory product, is directly related to the whole organism, particularly to the blood.

Recent advances in colloidal chemistry have shown that the diet has an influence on the composition of the blood. The pathologic conditions developing with the cutting of the deciduous as well as the permanent teeth and the premature loss of teeth revealed to the dental profession the significance of knowledge acquired from modern theories of nutrition.

Increasing efforts are being made to obtain information concerning those types of nutriment which produce harmful anatomical changes in the teeth or paradentium, as well as those which may produce the most efficacious influences on the dental tissue.

The well-known results of *McCollum, Howe, Marshall, May, Melanby, Bunting, Stanley, Lewinski, Misch, Zilva and Burnett* concerning the influence of nutrition on the dental system have been augmented only recently by further experimental research.

The direction in which an organism will react to a certain diet can be shown by a physio-chemical examination of the body fluids, the most important of which are the blood and the saliva. Thus, a deviation from the so-called normal composition should indicate disturbed nutrition.

In order to appreciate fully the enormous importance of biochem-

istry to our special branch of medicine, the most important results are briefly summed up as follows:

In all cases the saliva was completely analyzed into its cations and anions, as follows:

Cations: K, Ca, Mg, Na.

Anions: Cl, P (i. e.,  $\text{PO}_4$ ,  $\text{HCO}_3$ , CNS,  
the H-ion concentration (pH),  
the carbon dioxide capacity ( $\text{CO}_2$ ),  
and viscosity.

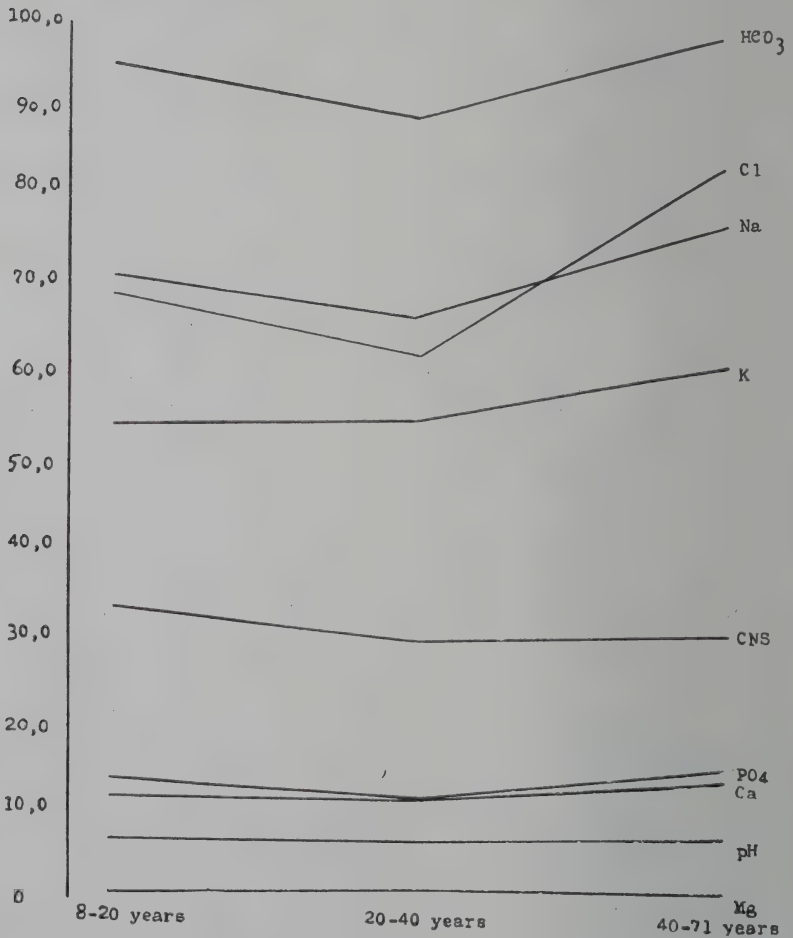


FIG. 7.

The examinations were made only on individuals with teeth intact and normal gums, and who were known not to have been ill within the last three or four years. A graphic representation of the average of 150

analyses distinctly illustrates the composition of the saliva-electrolytes under physiological conditions in different ages. (Fig. 7).

It is apparent that between the ages of 20 and 40 years, the excretion of cations and anions diminishes with the exception of potassium and increases noticeably with advancing age. With the aid of an arithmetical average for the different saliva-components, the following physiological standards have been computed:

$\text{HCO}_3$	=93.16 mg. %	(Determination according to Van Slyke)
Ph.	= 7.153 mg. %	(Determination with the chinhydronelectrode)
K	=55.89 mg. %	(Determination according to Kramer Tisdall)
Ca.	=12.13 mg. %	(Determination according to Kramer Tisdall)
Mg.	= 1.29 mg. %	(Determination according to Kramer Tisdall and Tschopp)
Na.	=69.88 mg. %	(Determination according to Tschopp)
Cl	=74.68 mg. %	(Determination according to Tschopp or Bang)
CNS	=30.90 mg. %	(Colorimetric method)
$\text{PO}_4$	=13.16 mg. %	(Determination according to Tschopp or Bell and Doisy)

In evaluating the results it was important to know the changes in the electrolyte composition of the saliva during any one day:

1. Potassium and sulfocyanide show the lowest values in the morning in the fasting saliva, then gradually the highest values are attained in the afternoon. They diminish again overnight until the lowest point is reached.

2. Calcium and chlorine show the reverse of potassium and sulfocyanide, the content being highest in the morning and overnight. During the day they remain nearly constant.

3. In comparison to the other cations the amount of magnesium is very small and shows the lowest fasting values. About noon it reaches its highest point and then gradually decreases. It would appear that the magnesium is inversely proportional to sodium but its peculiarities and functions are relatively unknown.

4. Phosphorus,  $\text{HCO}_3$  and the pH are the most unstable. No constant values could be found for them like those previously mentioned.

Owing to the variability in the electrolytic content of the saliva at different periods during the day, it is important to make examinations at the same hour each day. It has been found that for these examinations only "silent" saliva (the saliva present two or three hours after the last meal without the influence of irritation) can be used.



The important part of the results of an examination of the inorganic saliva constituents is as follows:

### 1. *Calcium.*

The calcium content of the saliva remains at nearly the same level until middle age when it falls rapidly with increasing age. As a rule the calcium concentration is inversely proportional to the amount of saliva secreted.

As a result of special experiments it has been found that the saliva is not a supersaturated solution of  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  as was formerly supposed. Thus the theory of calculus formation, founded on the principle of  $\text{CO}_2$  evaporation from the supersaturated solutions of calcium salts and subsequent concentration of colloids on the surface, suffers a serious setback.

By shake tests, as well by dialysis and ultrafiltration, a *negatively charged calcium compound which is absorbable by positively charged absorbents* is found in the saliva. This compound in the blood serum has been described recently by *Klinke*.

From the 13 mg. % Ca in the mixed silent saliva 2 mg. % are really ionized under physiologic normal conditions (Fraction 1), dialysable 6—7 mg. % and the excess over the real ionized part amounts to 4—5 mg. % (Fraction 2).

In two tests it has been found that:

a. After the addition of 5 gr. of KCl the potassium content decreases at first and increases slightly after 4 hours while at the same time Ca and Mg decrease. On the other hand the chloride and sulfocyanide as well as the hydrogen ion concentration distinctly increase for a short time.

b. An increase of sodium and phosphorus and like decrease in the chloride content follows the addition of 5 gr. of  $\text{NaHPO}_4$ .

### 2. *Phosphorus.*

An average of 4.5 mg. % inorganic phosphorus and 13.16 mg. %  $\text{PO}_4$  has been found for the mixed "silent" saliva in teeth relatively immune to caries. The phosphorus content of saliva in the young during the entire period of bone growth is very little greater, i. e. (14.06 mg. %  $\text{PO}_4$ ). The phosphorus content can amount to 15.5 mg. % and more during this period of growth, although the average is 12.2 mg. %. Between the ages of 20 and 40, after the completion of bone growth, the  $\text{PO}_4$  content of the saliva decreases to 12.06 mg. % and then increases in later years. On the whole, the phosphorus values of the saliva are higher than in the blood, owing to the fact shown by Camis that phosphorus containing substances are transformed through the activities of the glands.

### 3. *Potassium.*

Unlike the other electrolytes, potassium remains at the same level until around the fortieth year (circa 54.5 mg. %) and then increases strikingly (60.20 mg. %). In comparison to the blood the potassium content in the saliva is remarkably high and is surpassed only by sodium, which dominates the other body fluids as well.

### 4. *Sodium.*

The experiments of Tschopp, showing that the sodium content cannot be calculated from the chloride results, forced us to determine the sodium separately. In comparison to the average value of 69.88 mg. %, the sodium content during middle age is slightly decreased (65.99 mg. %); however, it never reaches the values in the blood (325.0 mg. %).

### 5. *Magnesium.*

The average value for magnesium in the mixed "silent" saliva (1.25 mg. %) is much less than in the blood. However, the fluctuations during the day may be very great, so it seems that no remarkable difference in the magnesium content of the saliva are dependent upon age.

### 6. *Chlorine.*

The chloride content of the saliva exhibits striking fluctuations similar to sodium, which are obviously caused by the intake of food and specific irritants. Moreover, there are considerable individual variations. In old age the chloride content increases to an average of 83.69 mg. %.

### 7. *Sulfocyanide.*

The values for sulfocyanide show not only striking fluctuations during the day, but also marked individual variations as well. My averages considerably exceed those mentioned in the literature, which may be due to the improvement in the colorimetric method by the use of the Dubosque colorimeter. Examinations of the influence of tobacco on the sulfocyanide content have shown that the smoking of one cigarette may change the sulfocyanide content very little; a cigar or a small quantity of Berhoda (I. G. Farbenindustrie) given per os can, however, increase the sulfocyanide content very considerably. Age has no striking influence on the sulfocyanide content of the saliva.

### 8. *Hydrogen Ion Concentration.*

The opinion of Lüscher that the  $\text{CO}_2$  tension in the mouth is responsible for the change of reaction of the saliva can be proven by experiment. It seems that there are many important processes working together. It is absolutely necessary in a critical examination of the pH of mixed saliva to determine individually the values for the secretions of the parotid, the submaxillary and sublingual glands. In most cases the reaction of the parotid saliva was below the neutral point, or acid; whereas the reaction of the submaxillary and sublingual saliva was alkaline. The pH of the mixed saliva is not the result of a simple mixture

of both secretions. The  $\text{CO}_2$  probably plays an important role in the chemical alteration of the mucin or it may be transposed with the protein.

In another experimental series it was shown that the carbohydrate group of the mucin was decomposed by bacteria into lactic acid,  $\text{CO}_2$  and water thus changing the reaction of the saliva to the acid side. Determinations of the complete and residual nitrogen of the saliva parallel with the hydrogen ion concentration show that in those cases of rather low complete and residual nitrogen values the pH is low also; while on the other hand in all cases with high mucin and protein content, as in pregnancy, the pH is extraordinarily high. These findings are well in accord with the acid values of the parotid, since its secretion is very rich in protein.

Systematic examinations of 120 city children showed that the highest alkaline values for the pH were found in children of 6 and 7 years, whereas the pH became lower with an increase in age.

Without considering my statistical material, it may be established that the fasting values are mostly acid. After food intake the saliva loses its acid character, remaining around neutral for two or three hours. No definite rule could be established regarding the change in pH in the saliva after food has been eaten or other exogenous factors have been introduced.

#### 9. *Viscosity.*

The determination of viscosity with the large laboratory viscosimeter according to *Prof. Hess (Zurich)* show an average of 1.9 for the mixed silent saliva. The frequency of decay and increased H-ion concentration are proportional to the increase in viscosity, and inversely so to the  $\text{CO}_2$  combining power.

#### 10. *$\text{CO}_2$ Capacity.*

Systematic examinations of individuals of all ages showed that in the young (8 years) the  $\text{CO}_2$  combining power of the mixed silent saliva, calculated as bicarbonate, is greater (95.14 mg. %) than in middle aged individuals (89.02 mg. %). In individuals over forty it increases again and reaches a maximum average of 97.64 mg. %. From the high bicarbonate ( $\text{HCO}_3$ ) values, which run parallel with the alkaline reaction of the saliva, it is evident that free  $\text{CO}_2$  must be present.

The values found have been worked up according to the biometrical principles, suggestion by *Martin*, in a tabulation of a frequency series for his figures.

#### 11. *Composition of Saliva during Pregnancy.*

Pathological processes frequently occur in the mouth during pregnancy, such as an increased appearance of caries or an inclination towards gingivitis and this induced us to examine the inorganic composi-



tion of the saliva during this time. A striking decrease of the Ca content to approximately 50 per cent of the normal value, with an increase of magnesium and phosphates was found. Moreover, the bicarbonates and sodium content were considerably decreased.

12. The last part of my investigations is concerned with the *quantitative analysis of the saliva of pyorrhea patients* whose mouth condition corresponds to the condition of "diffusive atrophy," (Gottlieb), and my supposition, that in certain cases of pyorrhea which were grouped under the heading of "presenile and diffuse atrophy," we are dealing with an expression of general disease, probably a disturbance of metabolism caused by nourishment unsuited to the organism or perhaps an endocrine disturbance, has found new support for this investigation.

It was shown in the investigated cases, that the potassium content increased to some extent and that the sodium showed a strong increase, whereas the calcium and  $\text{PO}_4$  were decreased to about 25 per cent and the Mg to 40 per cent. Therefore in both forms of paradentosis we have to do with a basic change of the electrolytic content of the saliva as compared with the normal value. *Weinmann* has reported, since, a diminution of the dynamic action of protein in 23 cases of acute diffuse atrophy. In other words, there is a general change taking place in the whole organism which our microscopes fail to help us to interpret. Changes, which are of a general nature, can lead to a generalized form of paradentosis and sometimes to local disease of the parodontium. It will be very difficult for us to approach more closely the clinically well known forms in a biochemical way. However, observations of the basal metabolism of pyorrhea patients may provide us with an extensive material as a key to the solution. My investigations are not yet sufficient to draw a satisfactory conclusion since they have been confined to mixed saliva.

A change in the basal metabolism, as we know from general medicine, may result and it is very hard to distinguish which factors in the individual cases contribute to the manifestations in the pathological pictures in the oral cavity. And that will be impossible until we have basal metabolic findings especially in well defined cases. We are proceeding slowly because, experimentally as well as in the practice, we must have an indication in human material that our therapeutic measures directed in accordance with the results of our investigation, result in an improvement in conditions in all cases. Our preliminary experiments are nearing completion, but there is much to do in the interest of suffering mankind if we are to free them of the greatest affliction of the oral cavity—pyorrhea, which is almost as frequent as caries.

How shall we be able to get an idea of the factors disposing to the development of pyorrhea? The methods of investigation of the



last year have brought so many truths to the practitioner that it appears unnecessary to begin again with partial investigations. Each pyorrhea patient should be examined from a purely medical standpoint to determine everything that might be of importance in the knowledge of his constitution and tendency to this disease. The dentist's report must be such that we have before us a clear picture of the minutest units of the entire jaw area. It is necessary that a plan of examination be agreed upon by which the investigation can develop. This examination has been planned so that the work can be combined in the Dental College and Medical School of the University of San Francisco, and a laboratory suitable for special biochemical studies has been provided. In this way pyorrhea research should advance.

As a result of this systematic collection of the great amount of material under an individual supervision, a knowledge of the relation of pyorrhea to definite general disturbances should be acquired soon. It is planned to combine the results of these investigations in a report at the end of the first year. It will probably be possible then to expand the lines of thought and to designate special research in definite directions.

As previously mentioned, the investigation falls into three great divisions:

1. A purely medical examination by a physician.
2. A thorough dental examination.
3. A biochemical investigation of the blood and saliva in the Hooper Foundation for Medical Research.

The single phases of the investigation are grouped in a questionnaire\* as follows (for the enlightenment and individual summing-up):

A. Clinical Status of Parodontosis (Pyorrhea)—*Medical Part.*

I. GENERAL (PREVIOUS) HISTORY.

a. Previous disease of patient.

1. Metallic poisoning (caused by professional duties, cures, amalgam injuries).
2. Other injuries due to occupation.
3. Gout.
4. Arthritic deformation.
5. Acute and chronic rheumatism of joints.
6. Diabetes.
7. Nephritis.
8. Diseases of the blood.
9. Diseases of the intestines.
10. Diseases of the liver and gall bladder.
11. Under and over-feeding.
12. Nervous psychic disturbance (cramps, paralysis, epilepsy).
13. Tuberculosis.
14. Syphilis.
15. Other infectious diseases (chronic tonsillitis, malaria, grippe).
16. Skin disease.
17. Vasomotor disturbances (genuine migraine, cold feet and hands, frost).
18. Avitaminosis.
19. Anaphylactic diseases (asthma, urticaria, hay-fever).
20. Lymphatism.
21. Pregnancies (labors and miscarriages).

---

\*A slight modification of the original questionnaire of the "Arbeitsgemeinschaft für Parodontosen-Forschung," Germany.

## ORIGINAL ARTICLES

- b. Which of the diseases listed under "a" are or were found in other members of the family?
- c. Does patient use alcohol or nicotine excessively?

### II. CLINICAL CONSTITUTIONAL CONDITIONS.

#### a. External Conditions:

1. Height (short, medium, tall). 2. Weight. 3. Structure of bones (curvature of spine, rachitis, asthenic-emphysematous constitution). 4. Muscular apparatus well developed, flabby. 5. Cushions of fat (scanty, abundant, normally distributed). 6. Skin or mucous membranes. (a. Thoroughly blooded, pale, spathic, moist, dry; b. Anomalies of hair growth, pigmented where? c. Oedema, Cyanosis; d. Myxoedema, Scleroderma, Exanthem).

#### b. Internal Organs:

1. Heart and vessels: a. Heart. b. Pulse. c. Blood-pressure. d. Capillaries—microscopic conditions. 2. Respiratory apparatus: a. Nose and accessory cavities. b. Larynx and Trachea. c. Lungs. 3. Stomach and Intestines. 4. Urine: a. Albumin. b. Sugar. c. Urobilin. d. Urobilinogen. 5. Chronic inflammatory changes (Prostata etc.).

#### c. Nervous System:

1. Reflexes: a. Anomalies of pupils (difference in size, distortion). b. Reaction of pupils to light. c. Patellar reflex. d. Babinski. e. Chvostek. f. Abdominal reflex. g. Tremor. h. Sensory disturbances. i. Disturbances of gait (ataxic or spastic). 2. Hysterical symptoms. 3. Organs of sense: a. Eye. b. Ear. c. Nose. 4. Special examination of the vegetative or sympathetic nervous system with: a. Atropin. b. Adrenalin. c. Pilokarpin. d. Loewi's reaction.

#### d. Condition of Blood:

a. Haemoglobin content. b. Number of red corpuscles. c. Number of white blood corpuscles. d. Color index. e. Condition of white blood corpuscles.

#### e. Examinations in the Laboratory:

1. Examination of metabolism: a. Basal change. b. Specific dynamic effect. 2. Serological examination of the blood. 3. Chemical examination of the blood: a. Blood sugar. b. Potassium. c. Calcium. d. Uric acid. e. Alkali reserve. f. Residual nitrogen. 4. Chemical examination of saliva.

#### f. Endocrine Stigmata:

1. Thyroid gland: (Normal, enlarged, reduced, hyper-hypothyreogenic symptoms, Exophthalmus, Enophthalmus). 2. Disturbances of generative glands: a. Disturbances of menstruation. b. Hypoplasia of testicles. c. Generative power. d. Anomalies

- of the secondary sexual characteristics. 3. Pituitary stigmata: a. X-ray picture of the sella turcia. b. Gigantism or nanism. c. Dystrophia adiposogenitalis. d. Diabetes insipidus. 4. Thymus (X-ray picture). 5. Parathyroid symptoms (Tetany, tending to spasm, Epilepsy).
- g. Is a definite constitutional type respectively a systematic disease indicated by the results of the examination?

B. Clinical Status of Paradentosis (Pyorrhoea)—*Dental Part.*

I. STATEMENTS OF THE PATIENT ABOUT THE CONDITIONS  
OF HIS MOUTH.

1. Have any members of the patient's family been affected by loosening of the teeth and consequent loss of teeth? If so, which members?
2. Has the patient undergone any orthodontic treatment in his youth? a. At what age? b. Did the gums bleed at that time? c. Had the patient at that time sensations of loosening teeth?
3. Has the patient suffered from bleeding of gums in his youth?
4. Has the patient gone through severe inflammation of the gums and the oral mucous membrane? When? Accompanied by fever? Loosening of teeth? Disturbances of other organs? How long did the illness last? Has its cause been found? What treatment was used?
5. Has the patient already undergone a treatment for paradentosis? When and by whom? What were the complaints at the time? What was the method of treatment? Was the trouble thereby relieved? How long was the treatment effective?
6. Has the patient already lost teeth by paradentosis? (Pyorrhoea). If so, which teeth?
7. Has the patient suffered with paradental or lateral abscesses on vital teeth and by what kind of treatment was the trouble relieved?
8. Is it necessary to remove tartar frequently? On which teeth?
9. Does the patient prefer one side of the mouth in mastication?
10. By what means and how often does the patient clean his teeth?
11. Is there at present a sensation of loose teeth? Of which teeth? Since when? Does it impair mastication? Have oscillations in the loosening been observed (during menstruation)?
12. Does the patient notice bleeding of gums when cleaning the teeth (biting in apples, etc.)? On which teeth? Since when? Have oscillations been observed? Has one part of the maxilla been especially affected?
13. Does the patient notice suppuration of the alveolus? On which teeth? Since when?

ORIGINAL ARTICLES

14. Are there any other complaints?
15. Are any teeth sensitive to mastication in the morning hours? Which?
16. Does the patient snore (because of chronic plugging up of the nose)?
17. Does the patient grit his teeth or does he press them together? At night? During the day?
18. Does the patient note peculiar sensations in the gums? (prickling, pulling, etc.)

II. SPECIAL CONDITIONS OF THE MOUTH.

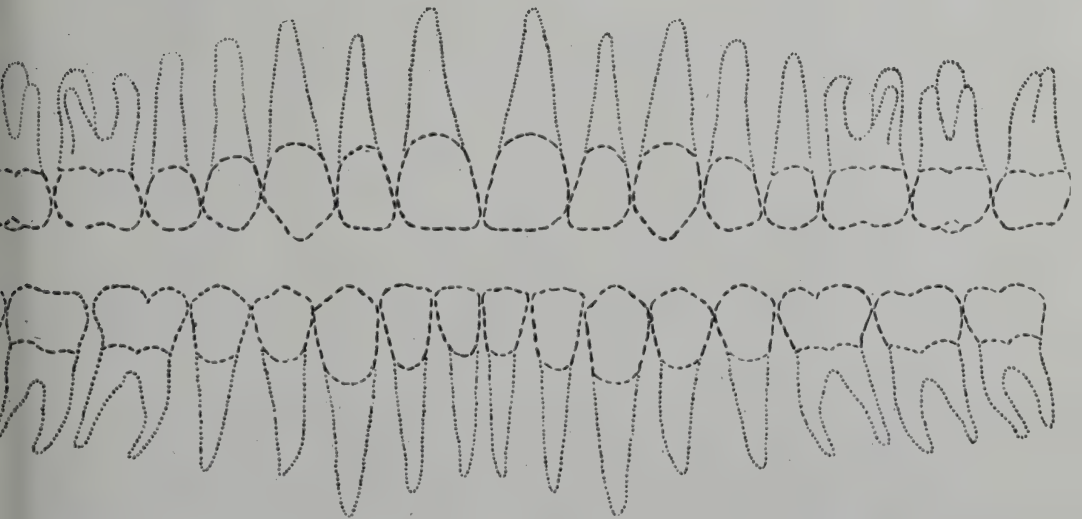
A. Secretion.

1. Viscosity of saliva? Watery? Elastic? Very ropy? 2. Inorganic composition of the saliva in mg. %: Potassium, Calcium, Magnesium, Sodium, Chlorine, Sulfocyanide, Phosphorus,  $\text{CO}_2$  combining power, H-ion concentration.

B. Sketch for the clinical-anatomical and clinical-functional state.

1. Course of the gum margin. 2. Inflammation. 3. Indentation of pocket. 4. Suppuration of pocket. 5. Loosening. 6. Diastema. 7. Lost teeth. 8. Root. 9. Fistula. 10. Interdental recesses. 11. Removable flaps of the gum. 12. Crowns, shell. 13. Crowns, dowel. 14. Crowns soldered together. 15. Solid bridges. 16. Removable bridges. 17. Plates. 18. Clamps. 19. Ground off masticatory surfaces, etc.

C. Clinical anatomical local conditions (Cf. Sketch, Model and X-ray pictures).



Right.

Left.



1. Extracted teeth? Teeth not erupted? Interdental gum margins? (Papillae of gums): Inflamed? Hypertrophic? Atrophic? Interdental recesses of gums? Pocket indentations? 4. Exposed necks of teeth: Vestibular? Lingual? 5. Alveolar gums: Inflamed? Sensitive to pressure? 6. Suppuration of pockets? 7. Tartar: Supragingival? Subgingival? 8. Projecting: Fillings? Edges of crowns? 9. Paradental abscesses: With fistula? Without fistula? 10. Distribution of various forms of atrophy among the individual parodontium (the tooth and all its surrounding tissues). a. Slight form of atrophy (supra alveolar indentation of pocket respectively, recess of gum up to 4 mm. combined with horizontal or vertical atrophy). b. Intermediate form of atrophy (same condition as under "a" up to 6 mm.). c. Severe form of atrophy: aa. Same condition as under "a" beyond 6 mm. bb. Vertical atrophy with intra alveolar pocket. cc. Gradation of vertical or horizontal atrophy. dd. Interdental recesses of bone. ee. Undermined cavities. ff. Fundamental form of vertical atrophy. 11. Supplementing X-ray picture: Resorption of tip of root? High level of apical base? Expansion of shadows of vessels? Diffuse widening of the periodontal line? Sclerosis of the corticallitis?

D. Clinical-Functional condition (Cf. Sketch and Model).

1. Does the patient show a nervous motion of the masticatory muscles? 2. Form of jaw bone. 3. Occlusion at: Closing bite, protruding bite, left lateral, right lateral. 4. High level of crown. 5. Diastema: a. As anomaly of position. b. As migratory phenomena. 6. Tilting. 7. Horizontal migration. 8. Abrasion of premolars and molars. 9. Abrasion of incisors. 10. Disturbing edges or processes of incisors with: a. Projecting bite. b. Left or right shift. 11. Loosening: 1st degree—slight; 2nd degree—perceptible; 3rd degree—marked; 4th degree—rotary; 5th degree—extreme.

E. Caries and Sequences of Caries.

1. Caries tendency: Immune, slight, severe. 2. Seats of caries: Shown by clinical examination; shown by X-rays. 3. Destruction of pulp: Without apical osteitic changes; with apical osteitic changes.

III. GENERAL DIAGNOSIS AND PLAN OF TREATMENT.

A. Clinical-Etiological Estimation of the Case.

B. Prognostic Therapeutic Estimation of the Case. Saving the teeth to be considered as: a. Fully justified. b. Partly justified. c. No longer justified.

# ORIGINAL ARTICLES

- C. Special Instructions for Internal General Treatment.
- D. Special Instructions for Local and Discharging (C) Treatment.
- E. Instructions for Self Treatment at Home.

It is clear to us from the above that it will not be possible to undertake in each pyorrhea case the same basic examination. The answering of the questions requires considerable time on the one hand, for the patient as well as for the individual department, so that not more than one patient a week can be handled. Then again it is not so easy to obtain patients who care to go through a tedious study. In other words, only the most carefully selected material and absolutely complete investigations may lead to results. And, moreover, dentistry can only show practical and scientific results, as a specialty of medicine, when it strives forward in the closest co-operation with medicine using the newest and most advanced methods of investigation.

## BIBLIOGRAPHY.

- Addison, H. F. and Appleton, J. L.: Bau und Wachstum der Nagezähne der weissen Ratte. *J. morphol.* 1915.
- Adloff, P.: Zur Frage der reaktionsfähigen und wenig reaktionsfähigen Gebisse im Sinne Gottliebs. *V. f. Z.* 1928, 44, (Nr. 3), 490.
- Adrion, W.: Vergleiche histologischer Untersuchungen über das Verhalten des Epithels am Zahnhals. *Deutsche Monatschr. f. Zahnh.* 1926, 44, (Nr. 3), 305.
- Bauer, W., and Lang, F. J.: Über das Wandern der Zähne. *Vrtljschr. f. Zahnh.* 1928, 44, (Nr. 3), 321.
- Bauer, W.: Über traumatische Schädigungen des Zementmantels der Zähne mit einem Beitrag zur Biologie des Zementes. *Deutsche Monatschr. f. Zahnh.* 1927, 45, (Nr. 17), 769.
- Bauer, W.: Zur Kenntnis der bisher als "Zementkutikula" bezeichneten Epithelhyalinmembran im Wurzelgebiet von Zähnen. *Ztschr. f. Stomatol.* 1926, 24, (Nr. 7), 606.
- Bauer, W.: Die Appositions — und Resorptionsvorgänge an Knochen und Zähnen. *Ztschr. f. Stomatol.* 1925, 23, (Nr. 3), 188.
- Becks, H.: Über die Wasserstoff-Ionen Konzentration des menschlichen Speichels, unter besonderer Berücksichtigung der jeweiligen  $\text{CO}_2$ -Verhältnisse innerhalb der Mundhöhle. *Deutsche Zahnärztl. Wehnschr.* 1928, 31, (Nr. 8).
- Becks, H.: Ergebnisse neuerer Speicheluntersuchungen, mit besonderer Berücksichtigung der Gravidität und der Parodontosen. In Press.
- Bencze, L.: Befunde an der Dentinzementgrenze. *Ztschr. f. Stomatol.* 1927, 25, (Nr. 9), 887.
- Benninghoff: Über die Anpassung der Knochenkompakta an geänderten Beanspruchungen. *Studien zur Architektur des Knochens. Anat. Anz.* 1927, 63, 18-20.
- Box, H. K.: Studies in Periodontal Pathology. The Canadian Dental Research Foundation and Department of Health, Province of Ontario, May, 1924, Bulletin 7.
- Box, H. K.: The Dentinal-Cemental Junction. *Oral Health*, 1922, 12, 185.
- Box, H. K.: The Evolution of the Periodontal Pus Pocket. *J. A. D. A.* 1921, 8, 599-608.
- Chaim, A.: Der hypertonisch-spastische Typ im Bilde der Parodontose. *Vrtljschr. f. Zahnhlk.* 1926, 42, (Nr. 4), 536.
- Endelmann, J. and Wagner, A. F.: General and Dental Pathology. St. Louis, C. V. Mosby and Co.
- Euler, H.: Der "Epithelansatz" in neuerer Beleuchtung. *Vrtljschr. f. Zahnhlk.* 1923, 39, (Nr. 1).
- Euler, H.: Spezielle Pathologie der Wurzelhaut und des Zementes. *Ergebn. d. ges. Zahnhlk.* 1923, 3, (Nr. 5), 451.
- Euler, H.: Die idiopathische (nicht entzündliche) Periodontalwucherung, ein gesondertes Krankheitsbild in der Wurzelhautpathologie. *Deutsche Zahnärztl. Wehnschr.* 1922, 25, (Nr. 6/7).
- Euler, H.: Die Rissfraktur am Wurzelzement. *Ztschr. f. Stomatol.* 1927, 25, (Nr. 8), 801.
- Euler and Meyer: Pathohistologie der Zähne. Munich, 1927. Verlag: Bergmann.
- Fleischmann and Gottlieb, B.: Beiträge zur Histologie und Pathogenese

- der Alveolarpyorrhoe. Ztschr. f. Stomatol. 1920, 18, (Nr. 2), 1.
- Gottlieb and Greiner: Der histologische Bau der Meerschweinchenmolaren. Ztschr. f. Stomatol. 1923, 21, (Nr. 10), 1.
- Gottlieb, B.: Alveolaratrophie und Alveolarpyorrhoe mit besonderer Berücksichtigung der Biologie des Zementes. Ergebn. d. ges. Zahnhlk. 1922, 6, (Ergänzungsband), p. 43.
- Gottlieb, B.: Der Randschluss des Goldinlays. Ztschr. f. Stomatol. 1927, 25, (Nr. 1), 16.
- Gottlieb, B.: Der Epithelansatz am Zahn. Deutsche Monatschr. f. Zahnhlk. 1921, 39, (Nr. 5), 142.
- Gottlieb, B.: Die Paradentalpyorrhoe der Rattenmolaren. Vrtljschr. f. Zahnhlk. 1922, 38, (Nr. 3).
- Gottlieb, B.: Die Veränderungen der Zähne und Kiefer bei experimenteller Hunderachitis. Ztschr. f. Stomatol. 1925, 23, p. 554.
- Gottlieb, B.: Die Behandlung der sog. Alveolarpyorrhoe und der anderen Parodontosen. Ztschr. f. Stomatol. 1924, 22, (Nr. 7), 1.
- Gottlieb, B.: Die diffuse Atrophie des Alveolarknochens. Ztschr. f. Stomatol. 1923, 21, (Nr. 4), 195.
- Gottlieb, B.: Histologie und Pathogenese der Alveolarpyorrhoe. Ztschr. f. Stomatol. 1920, 18, (Nr. 2).
- Gottlieb, B.: Moderne Behandlungsmethoden der Alveolarpyorrhoe. Zahnärztl. Rundschau 1925, 34, (Nr. 28).
- Gottlieb, B.: Paradentalpyorrhoe und Alveolaratrophie. Die Fortschr. d. Zahnh. 1925, 1, (Nr. 8), 519. 1926, 2, (Nr. 5), 363. 1927, 3, (Nr. 5), 366. 1928, 4, (Nr. 5), 398.
- Gottlieb, B.: Schmutzpyorrhoe, Paradentalpyorrhoe und Alveolaratrophie. Verlag: Urban und Schwarzenberg, Wien, 1925.
- Gottlieb: The Gingival Margin. Report of the Proceedings of the 6th Australian Dental Congress, Melbourne, Victoria, August, 1927.
- Gottlieb, B.: Tissue Changes in Pyorrhea. J. A. D. A. 1927, 14, p. 2178.
- Gottlieb, B.: Über Schmelzhypoplasie und Rachitis. Vrtljschr. f. Zahnh. 1920, 36, (Nr. 2).
- Gottlieb, B.: Zementexostosen, Schmelztropfen und Epithelnekrose. Ztschr. f. Stomatol. 1921, 19, (Nr. 9), 515.
- Gottlieb, B.: Zur Ätiologie und Therapie der Alveolarpyorrhoe. Ztschr. f. Stomatol. 1920, 18, (Nr. 2), 59.
- Gottlieb, B.: Zur Biologie des Epithelansatzes und des Alveolarrandes. Deutsche Zahnärztliche Wchnschr. 1922, 25, (Nr. 35), 434.
- Greve, K.: Histologische Untersuchungen zur Frage der Schädigung des Parodontiums durch Kronenringe. Deutsche Monatschr. f. Zahnh. 1926, 44, (Nr. 21), 791.
- Grohs, R.: Veränderung der Schmelzepithelien während der Entwicklung und beim Durchbruch des Zahnes. Ztschr. f. Stomatol. 1927, 25, (Nr. 4).
- Häupl, K.: Zur Pathogenese der Parodontitis profunda. (Ein Beitrag zur Kenntnis der Gewebsveränderungen und Vorgänge im Parodontium unter den Bedingungen geänderter, bzw. gesteigerter funktioneller Beanspruchung. Vrtljschr. f. Zahnh. 1926, 42, (Nr. 3 and 4).
- Häupl, K.: Mikroskopische Befunde bei Gingivitis und den durch sie bedingten Veränderungen der Alveolarkuppe nebst einigen Bemerkungen zur Frage der sogen. Alveolarpyorrhoe. Vrtljschr. f. Zahnh. 1925, (Nr. 1).
- Häupl, K.: Parodontitis Marginalis. Den Norske Tandlaegeforenings Tidende. 1924, 35, (Nr. 7), 349.
- Häupl, K.: Zur Klinik, Diagnostik und Therapie der Parodontitis marginalis. Ztschr. f. Stomatol. 1926, 24, (Nr. 2), 85.
- Häupl, K. and Lang, F. J.: Marginale Parodontitis, Entgegnung auf die Randbemerkungen B. Orban's. Ztschr. f. Stomatol. 1927, 25, (Nr. 11), 1110.
- Hartzell, B.: Etiology of pyorrhea alveolaris with a simplified treatment. J. A. D. A. 1925, 12, (Nr. 7), 784.
- Hatton, E. H.: Microscopic studies of diseased Peridental Tissues. J. A. M. A. 1918, 71, 1549.
- Hedema, E. H.: Der Zusammenhang von Veränderungen des Zahnfleischwalles und Veränderungen in den tieferen Partien des Parodontiums mit besonderer Berücksichtigung der Alveolarpyorrhoe. Inaugural Dissertation, Berlin, 1926.
- Howe: The Interpretation of Dental lesions in the light of recent Research. J. of Dent. Res. 1927, 7.
- Kantorowicz, A.: Das Wesen und die Behandlung der Parodontitis. Zahnärztl. Rundschau, 1925, 34, (Nr. 26), 393.
- Kantorowicz, A.: Klinische Zahnheilkunde. Verlag: Hermann Meusser, Berlin 1924.
- Kellner, E.: Histologische Befunde an antagonistischen Zähnen. Ztschr. f. Stomatol. 1928, 26, (Nr. 3).
- Ketscham, A. H.: A preliminary report of an investigation of apical root resorption of permanent teeth. Int. J. Orthod. Oral Surg. Radiogr. 1927, 13, (Nr. 2).
- Klein, A.: Systematische Untersuchungen über die Periodontalbreite. Ztschr. f. Stomatol. 1928, 26, (Nr. 4).
- Köhler, J.: Verwachsungen zwischen Zahn und Knochen. Ztschr. f. Stomatol. 1927, 25, (Nr. 9).
- Kotanyi, E.: Histologische Befunde an Milchzahnresten. Ztschr. f. Stomatol. 1924, 22 (Nr. 11), 1.
- Kotanyi, E.: Histologische Befunde an retinierten Zähnen. Ztschr. f. Stomatol. 1925, 23, p. 516.
- Kotanyi, E.: Histologische Befunde an retinierten Zähnen. Ztschr. f. Stomatol.



# ORIGINAL ARTICLES

- Kotanyi, E.: Die Veränderungen der Zähne und ihrer Umgebung bei experimentellem Skorbut des Meerschweinchens. *Ztschr. f. Stomatol.* 1927, 25, (Nr. 7).
- Kranz and Falk: *Alveolarpyorrhoe*. Verlag: Hermann Meusser, Berlin, 1922.
- Kronfeld, R.: Einige histologische Befunde an Schafzähnen. *Schweizer Monatschr. f. Zahnh.* 1926, 36, (Nr. 6), 392.
- Kronfeld, R.: Die Zementhyperplasien an nicht funktionierenden Zähnen. *Ztschr. f. Stomatol.* 1927, 25, (Nr. 12).
- Kronfeld, R.: Spielt die Qualität der Hartsubstanzen bei der Resorption eine Rolle? *Ztschr. f. Stomatol.* 1927, 25, (Nr. 11), 1099.
- Kronfeld, R.: Zement und Sharpeysche Fasern. *Ztschr. f. Stomatol.* 1928, 26, (Nr. 7).
- Kronfeld, R. and Ullik, R.: Brechen auch bei wilden Tieren die Zähne kontinuierlich durch? *Ztschr. f. Stomatol.* 1928, 26, (Nr. 1), 84.
- Landsberger, R.: Der makroskopische Beweis für die organische Einheit des Zahnes. *Deutsche Monatschr. f. Zahnh.* 1926, 44, (Nr. 7), 291.
- Landsberger, R.: Die organische Einheit und der Zahndurchbruch. *Zahnärztl. Rundschau*, 1928, (Nr. 41), 1686.
- Landsberger, R.: Histologische Untersuchungen über das alveolare Wachstum in seiner Beziehung zu der Entwicklung des Zahnkeims. *Deutsche Monatschr. f. Zahnh.* 1928, 41, (Nr. 14).
- Lang, F. J.: Von den mikroskopischen Befunden der Knochenbildung. *Ztschr. f. d. ges. Anat. Abtlg. J*: *Ztschr. f. Anat. und Entwicklungsgesch.* 1925, 57, (Nr. 3/4).
- Lewis, J. M.: Some Observations on the Pathology of Pyorrhea Gingiva. Report of the 6th Australian Dental Congress, Melbourne, Victoria, 1927.
- Loos, O.: Über die Ursachen des sogenannten Längerwerdens der Zähne bei fehlenden Antagonisten. I. H. Ed. Seitz, Strassburg, 1909.
- Lund: Über die Epithelkutikula. *Vrtljschr. f. Zahnh.* 1924, (Nr. 1).
- McCall, J. O. and Box, Harold K.: The Pathology and Diagnosis of the Basic Lesions of Chronic Periodontitis. J. A. D. A. 1925.
- McCall, J. O. and Box, Harold K.: Chronic periodontitis. J. A. D. A. 1925, (Nr. 11), 1300.
- Meyer, W.: Die Bereitschaftstellung des Parodontiums und der Knochenabbau bei der sogen. Alveolarpyorrhoe. *Ztschr. f. Stomatol.* 1924, 22, (Nr. 9), 591.
- Meyer, W.: Die Vitalität des Zementes. *Vrtljschr. f. Zahnh.* 1924, (Nr. 4).
- Meyer, W.: Unmittelbare Schädigung des Kieferknochens bei tiefem Biss. *Ztschr. f. Stomatol.* 1927, 25, p. 1167.
- Neumann, R.: Die Behandlung der sogen. Alveolarpyorrhoe und der anderen Parodontosen. Verlag: Hermann Meusser, Berlin, 1923.
- Oppenheim, A.: Die Veränderungen der Gewebe, insbesondere des Knochens bei der Verschiebung der Zähne. *Vrtljschr. f. Zahnh.* 1911, (Nr. 4).
- Orban, B.: Die organische Einheit und der Zahndurchbruch. *Zahnärztl. Rundschau*, 1928, (Nr. 52), 2194.
- Orban, B.: Tissue Changes in Traumatic occlusion. J. A. D. A., 1928, 15, (Nr. 11), 2090.
- Orban, B.: Das normale Parodontium der Hunde. *Ztschr. f. Stomatol.* 1924, (Nr. 12).
- Orban, B.: Ist das Parodontium eine "organische Einheit"? *Ztschr. f. Stomatol.* 1926, 24, (Nr. 6).
- Orban, B.: Zur Histologie des Schmelzes und der Schmelzdentingrenze. *Vrtljschr. f. Zahnh.* 1926, (Nr. 3).
- Orban, B.: Beziehungen zwischen Zahn und Knochen, Bewegung der Zahnkeime. *Ztschr. f. Anat. u. Entwicklungsgesch.* 1927, 23, (Nr. 5/6).
- Orban, B.: Schmelz und Zahnoberhäutchen. Schmelzlamellen und Büschel. *Ztschr. f. Stomatol.* 1926, 24, (Nr. 2), 1.
- Orban, B.: Epithel in der Pulpa. *Schweizer Monatschr. f. Zahnh.* 1927, (Nr. 9), 610.
- Orban, B.: Schmelzlamellen und Schmelzbüschel. *Deutsche Monatschr. f. Zahnh. h.* 1927, (Nr. 7), 334.
- Orban, B.: Dental Histology and Embryology. Chicago, 1928.
- Orban, B. and Köhler: Die physiologische Zahnfleischtasche, Epithelansatz und Epitheltiefenwucherung. *Ztschr. f. Stomatol.* 1924, 22, (Nr. 6), 353.
- Orban, B. and Weinmann, J.: Die ursächlichen Bedingungen für den Abbau der Hartsubstanzen. *Virchows Arch. f. Path. Anat.* 1928, 267, p. 446.
- Pommer, G.: Zur Kenntnis der mikroskopischen Befunde der Knochenanbildung und ihrer Untersuchungsmethoden. (nebst Bemerkungen zur Osteoklastenlehre). *Ztschr. f. Anat. u. Entwicklungsgesch.* 1925, 75, (Nr. 3/4).
- Pommer, G.: Die lakunäre Resorption im erkrankten Knochen. *Sitzungsberichte der Akademie der Wissenschaften*, 1881, 83, (Nr. 2).
- Praeger, W.: Beiträge zur vergleichenden und pathologischen Anatomie des Zahnfleischwalles. *Vrtljschr. f. Zahnh.* 1927, 43, (Nr. 2), 225.
- Praeger, W.: Studien über das sekundäre Zement bei einem Falle von Parodontalpyorrhoe. *Deutsche Monatschr. f. Zahnh.* 1926, 44, (Nr. 2), 66.
- Rebel, H.: Beitrag zur inneren Zementbildung durch echte. *Ztschr. f. Stomatol.* 1920, 18, (Nr. 9), 335.
- Robinsohn, T.: Versuch einer einheitlichen morphologischen Erklärung des normalen und pathologischen Wachstums der Zähne und des Kiefers *Ztschr. f. Stomatol.* 1924, 22, (Nr. 5), 285.



# THE PACIFIC DENTAL GAZETTE

- Robinson, T.: Weitere Beiträge zur Theorie der hormonalen Morphogenese der Zähne. Ztschr. f. Stomatol. 1926, 24, (Nr. 1), 1.
- Römer, O.: Periodontitis und Periostitis alveolaris. Handbuch der Zahnheilkunde, 4. Aufl., 2. Bd. 1924.
- Römer, O.: Die pathologisch-anatomischen Grundlagen der sog. Alveolarpyorrhoe. Deutsche Zahnheilk., Wissen und Können. Ein Band zu Ehren von Alfred Gysi. 1925, (Nr. 66), 15.
- Römer, O.: Die Pathologie der Zähne. Handbuch der spez. Pathologischen Anatomie und Histologie 1928, Teil 2, Band 4, 135.
- Rywikind, A.: Über Zementablagerung in den Wurzelkanälen und der Pulpakammer. Ztschr. f. Stomatol. 1926, 24, (Nr. 11), 923.
- Sachs, H.: Über den psychogenen Faktor bei Paradentosen. Vrtljschr. f. Zahnheilkunde. 1926, 42, (Nr. 4), 508.
- Schwarz, A. M.: Mathematische Überprüfung belasteter Zähne. Ztschr. f. Stomatol. 1928, 26, (Nr. 4).
- Schwarz, A. M.: Die Einstellung der Sechsjahr-Molaren hinter dem Milchgebiss. Ztschr. f. Stomatol. 1927, 25, (Nr. 5), 1.
- Schwarz, A. M.: Über die Bewegung belasteter Zähne. Ztschr. f. Zahnheilkunde. 1928, 26, (Nr. 1), 40.
- Skillen, W. G.: Histological and Pathological Studies of the Peridental Membrane Cementum and Dentin with Reference to Infections. J. A. D. A. 1921, (Nr. 8), 621.
- Skillen, W. G. and Mueller, E.: Epithelium and the Physiologic Pocket. J. A. D. A. 1927, 24, (Nr. 7), 1149.
- Steadmann, F. St. J.: Pyorrhea Alveolaris. Verlag: Henry Kimpton, London, 1927.
- Stein, G. und Weinmann, J.: Die physiologische Wanderung der Zähne. Ztschr. f. Stomatol. 1925, 23, p. 733.
- Stillmann, P. R.: The significance of traumatic occlusion. Report of the proceedings of the 6th Australian Dental Congress. 1927, p. 133.
- Stillmann, P. R.: Physical culture of the gingiva. Dental Cosmos 1924.
- Stillmann, P. R.: Traumatic occlusion, J. A. D. A. 1925, (Nr. 11), 1330.
- Weber, R.: Über experimentelle Erzeugung atypischer Epithelwucherungen am wachsenden Zahnkeim. Deutsche Monatschr. f. Zahnheilkunde. 1925, 43, (Nr. 13), and 1926, 44, (Nr. 6), 217.
- Weinmann, J.: Stoffwechselbefunde bei der diffusen Atrophie des Alveolarknochen. Ztschr. f. Stomatol. 1927, 25, (Nr. 8), 822.
- Weinmann, J.: Histologische Untersuchung eines Kiefers mit Stellungsanomalie der Zähne. Deutsche Monatschr. f. Zahnheilkunde. 1927, (Nr. 13), 589.
- Weinmann, J.: Das Knochenbild bei Störungen der physiologischen Wanderung der Zähne. Ztschr. f. Stomatol. 1926, 24, (Nr. 5).
- Weinmann, J.: Zur Frage der organischen Einheit von Zahn und Alveolarknochen. Ztschr. f. Anat. u. Entwicklungsgesch. 1927, 83, (Nr. 5/6).
- Weski, O.: Röntgenologisch-Anatomische Studien aus dem Gebiete der Kieferpathologie. Vrtljschr. f. Zahnheilkunde. 1921, 37, (Nr. 1), and 1922, (Nr. 1).
- Weski, O.: Beiträge zur Histologie des Zementes. Deutsche zahnärztliche Wchnschr. 1926, 29, (Nr. 29), 511.
- Wüstenhagen, H.: Die physiologische Resorption des Alveolarfortsatzes bei Jugendlichen. Deutsche Monatschr. f. Zahnheilkunde, 1923, (Nr. 20).
- Znamensky, N.: The Pathology and Treatment of Peridental Disease (Pyorrhea Alveolaris). 17. Internat. Congr. Med. Sect. 17, Stomatology, 1913, 17.



4155

Electrolytes of Saliva Under Normal and Pathological Conditions.

H. BECKS. (Introduced by K. F. Meyer.)

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University  
of California, San Francisco.*

The growing perception of the close relations of saliva to the teeth and the surrounding tissues led to systematic analyses of the mixed saliva in order to obtain normal or standard values for the electrolytes and thus a foundation for the study of this secretion under pathological conditions. The examinations of the physiological resting saliva were made on persons with absolutely intact teeth and normal gum tissues, and, who were known not to have been sick within the last 3 or 4 years. In all cases the saliva has been analyzed as to its content of cations and anions, namely Cations: K, Ca, Mg, Na; Anions: Cl, P, (*i. e.*,  $\text{PO}_4$ ), CNS, as well as the H-ion concentration (pH). The  $\text{CO}_2$  capacity and viscosity.

1. It was found that under physiological conditions the excretion of cations and anions diminishes, with the exception of potassium (between 20 and 40 years) but noticeably increases with an advance in age.

2. By an arithmetical average for the different saliva components the following normal standard values have been determined:  $\text{HCO}_3=93.16$  mg.% (Determination according to van Slyke).

pH= 7.15 (Determination with the Quinhydronelectrode).

K=55.89 mg.% (Determination according to Kramer Tisdall).

Ca=12.13 mg.% (Determination according to Kramer Tisdall).

Mg= 1.29 mg.% (Determination according to Kramer Tisdall and Tschopp).

Cl=74.68 mg.% (Determination according to Tschopp or Bang).

$\text{PO}_4=13.16$  mg.% (Determination according to Tschopp or Bell and Doisy).

CNS=30.9 mg.% (Colorimetric method).

3. Electrolyte composition of the saliva during one day:

a. Potassium and Sulfocyanide show the lowest values in the

## ELECTROLYTES OF SALIVA

morning before breakfast, and then increase slowly, having the highest percentage in the afternoon; overnight the values diminish until the lowest point is again reached.

b. Calcium and Chloride contents vary in opposite directions to the potassium and sulfocyanide, being highest in the morning and overnight. During the day they remain nearly constant.

c. In comparison to the other cations the amount of magnesium is very small, showing the lowest values before breakfast in the morning. About noon it reaches the highest point and then gradually decreases. It seems that the magnesium is found inversely proportional to sodium; about its properties and functions in the body however little is known.

d. Phosphorus ( $\text{PO}_4$ ),  $\text{HCO}_3$  and pH are least constant; no constant values could be found as for the electrolytes mentioned under a-c.

4. The H-Ion concentration of the saliva collected from the parotid differs fundamentally from the mixed saliva of the same individual. In fact, the parotid saliva is primarily acid, while the secretion of the sublingual and submaxillary glands falls into the alkaline range.

5. A Calcium compound which is negatively charged and readily absorbed by positively charged absorbents is present in the saliva. The compound is probably the main factor in the formation of tartar.

6. Through a special mode of experimentation it is now proven that the saliva is not a saturated solution of  $\text{CaCO}_3$  and  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ .

7. In the majority of the tooth pastes now available on the market readily soluble Ca salts have been demonstrated. These salts increase temporarily at least the Ca content of the saliva and lead to retention and depositions in the interdental spaces. Other substances of the pastes exert an absorbing action on the negatively charged Ca compound of the saliva and accelerate the precipitation.

8. Examinations of the mixed saliva collected from patients with pyorrhea have shown that in the majority of instances the composition reveals a marked increase of the cations over the values established for the individuals with mouths free from pyorrhea. In particular the amounts of K and Na are higher while correspondingly the other values are decreased. The Ca and  $\text{PO}_4$  percentages are reduced approximately 25% and the amount of Mg even 40%.

9. Examination of the saliva during pregnancy has shown that the Mg is increased (in contrast to pyorrhea) and the Ca content reduced to approximately 50% of the normal value.





S A M M L U N G M E U S S E R

Abhandlungen aus dem Gebiete der klinischen Zahnheilkunde

Herausgegeben von Professor Dr. Alfred Kantorowicz, Bonn

---

Heft 20

# Ergebnisse neuerer Speichel-Untersuchungen

mit besonderer Berücksichtigung der Gravidität  
und der Parodontosen

Von

Dr. med. et med. dent. Hermann Becks

z. Zt. Dental College und George Williams Hooper Foundation for Medical Research,  
University of California, San Francisco

VERLAG VON HERMANN MEUSSER / BERLIN









Dr. med. et med. dent. Hermann Becks

Ergebnisse neuerer Speichel-Untersuchungen



# Ergebnisse neuerer Speichel-Untersuchungen

mit besonderer Berücksichtigung der Gravidität  
und der Parodontosen

Von

Dr. med. et med. dent. Hermann Becks

z. Zt. Dental College und George Williams Hooper Foundation for Medical Research,  
University of California, San Francisco

Berlin

Verlag von Hermann Meusser

1929



Alle Rechte vorbehalten

Druck der Spamerschen Buchdruckerei in Leipzig

# Inhalt.

Einleitung . . . . .	1
Ältere Angaben über quantitative Speichelanalysen. . . . .	2
Unsere heutige Kenntnis von der Zusammensetzung der getrennten Munddrüsensekrete und den Aufgaben der Speichelelektrolyte. . . . .	5
Eigene Untersuchungen . . . . .	8
I. Material und Methodik . . . . .	8
II. Bestimmung physiologischer Standardwerte und experimentelle Untersuchungen	10
a) Wasserstoffionenkonzentration . . . . .	10
b) Viskosität . . . . .	17
c) Kohlensäurekapazität . . . . .	21
d) Kationen . . . . .	25
1. Kalzium . . . . .	27
2. Kalium . . . . .	33
3. Natrium . . . . .	36
4. Magnesium . . . . .	37
e) Anionen . . . . .	38
1. Chlor . . . . .	38
2. Phosphor . . . . .	39
3. Rhodan . . . . .	41
4. Bikarbonate (s. Kohlensäurekapazität) . . . . .	21
III. Biometrische Auswertung der Ergebnisse . . . . .	44
IV. Speichelzusammensetzung während der Gravidität . . . . .	46
V. Speichelzusammensetzung bei Parodontosen . . . . .	49
Zusammenfassung . . . . .	55
Anhang . . . . .	58
Literaturverzeichnis . . . . .	62



## Einleitung<sup>1)</sup>.

Unsere Kenntnis von dem Ablauf physiologischer Vorgänge innerhalb der Mundhöhle ist bedauerlicherweise noch so gering, daß wir in vielen Fällen nicht in der Lage sind, daraus eine Erklärung für die verschiedenen pathologischen Veränderungen im Bereiche der Zähne zu geben. Die Wechselbeziehungen der Körperfunktionen zu den Organen, ihre Änderung unter physiologisch-normalen und pathologischen Verhältnissen sind so mannigfaltig, daß wir fast täglich vor neuen Aufgaben gestellt werden. Noch heute stehen wir vor einer einheitlichen Beantwortung des Kariesproblems; die fast unüberwindbar erscheinenden Schwierigkeiten zur Klärung des Schmelzvitalismus sowie des physikalisch-chemischen Verhaltens des Zahnes beruhen auf einer gewissen einseitigen Einstellung der früheren über dieses Gebiet erschienenen Arbeiten in methodischer Hinsicht. Über das Verhalten des Schmelzes zu seiner Umgebung herrschen noch vollständig ungenügende Vorstellungen, und meines Erachtens nach kommen wir mit rein physikalisch-chemischen Untersuchungen, wie sie in jüngster Zeit von L. J. R. Brown, Andresen, Bauchwitz, Freibusch, Hermann, Pickerill, Koffke, Radosevic u. a. ausgeführt wurden, nicht eher weiter, bevor wir nicht eine genaueste Differenzierung des in Frage kommenden Gewebes, also des Zahnes, auf die über qualitative und quantitative Analysen der Mundflüssigkeit unter normalen und pathologischen Verhältnissen verfügen.

Bei Durchsicht der für diese Fragen maßgebenden Literatur fällt sofort auf, daß über die Speichelkomponenten nur sehr wenige Arbeiten vorliegen, von denen nur einige bei näherer Betrachtung aus den verschiedensten Gründen nicht verteidigt werden können. Man muß sogar erstaunt sein, daß unsere neuesten Lehrbücher, selbst Handbücher der Physiologie, heute noch als maßgebend Übersichten über qualitative Speichelanalysen bringen, die in das Jahr 1896 und sogar 1881 zurückreichen.

<sup>1)</sup> Vorliegende Untersuchungen wurden auf Veranlassung von Herrn Prof. Herrenknecht, in Anerkennung des außerordentlichen Bedeutung des Speichels für das Zahnsystem sowie als Hilfsmittel evtl. vorhandener Stoffwechselstörungen, am zahnärztlichen Institut in Freiburg vorgenommen. Für die mannigfachen Anregungen sowie für das freundliche Entgegenkommen bei Überwindung mancherlei Schwierigkeiten sei es mir gestattet, Herrn Prof. Herrenknecht meinen ganz besonderen Dank zu sagen.

Die Veröffentlichung dieser Untersuchungen, die durch die ungünstig gelegenen Verhältnisse der zahnärztlichen Presse in Deutschland etwa ein Jahr nach Abschluß der Arbeit erfolgt, verdanke ich vornehmlich dem Verlag Meusser, insbesondere dem freundlichen Entgegenkommen des Herrn Dr. H. Meusser. Für eine finanzielle Beihilfe, durch die die Drucklegung umfangreichen Materials an Kurven und Tabellen eigentlich erst ermöglicht wurde, gebührt aufrichtigster Dank Herrn Prof. Dr. Guy Millberry, Dekan des Dental College, sowie Herrn Prof. Dr. K. F. Meyer, Direktor der George Williams Hooper Foundation for Medical Research in San Francisco (Kalifornien).

Die Arbeit wurde im April 1928 abgeschlossen.



Unsere physiologisch-chemischen Vorstellungen sind seit diesen Jahren besonders durch die Fortschritte der Kolloidchemie einen großen Schritt vorwärts getragen worden, so daß es dringend geboten erscheint, diese Angaben an Hand der feinsten in der Medizin gebräuchlicher Mikromethoden einer genauen Nachprüfung zu unterziehen und zu ergänzen. Es darf nicht verkannt werden, daß sich bei derartigen mikroanalytischen Durcharbeitung des Speichels gleich zu Beginn schon ganz erhebliche Schwierigkeiten entgegenstellen, die vorwiegend materieller Art sind. Durch das Entgegenkommen der Notgemeinschaft der Deutschen Wissenschaft wurde es aber ermöglicht, eine breite Basis für umfangreiche Untersuchungen zu schaffen. Sodann setzen derartige Mikroanalysen, wenn sie Ansprüche auf Genauigkeit machen wollen, nicht nur eine längere Einarbeitungszeit in der Hauptsache für Blutuntersuchungen angegebenen Methoden voraus, sondern vor allen Dingen auch genaueste Kenntnisse von den chemischen Gesetzen und den sich in der Mundhöhle abspielenden Prozessen.

Die große Bedeutung, die in neuester Zeit den Salzen des Speichels als einer elektrolytisch-kolloidalen Systems bei der mutmaßlichen Remineralisation des Schmelzes zugeschrieben wird, sowie der Wunsch, aus der Verschiedenheit der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung der anorganischen Bestandteile des Speichels einen Anhaltspunkt für etwa vorhandene Stoffwechselstörungen zu erhalten oder jedenfalls Rückschlüsse daraus auf krankhafte Veränderungen innerhalb der Mundhöhle ziehen zu können, ließen es daher angezeigt erscheinen, die Elektrolyte des menschlichen Speichels unter ganz bestimmten Bedingungen kennenzulernen.

## A. Ältere Angaben über quantitative Speichelanalysen.

Wenn wir uns zunächst ein Bild von der Tätigkeit der Speicheldrüsen unter ihren Bedingungen machen wollen, so finden wir darüber eine größere Anzahl ausgezeichnete Untersuchungen, die uns über die wichtigsten Gesetze Aufschluß geben. Wir wissen aus ihnen, daß die Speicheldrüsen reflektorisch erregt werden, daß bedingte und unbedingte Reflexe mannigfaltigster Art dieselben ineinandergreifen und kennen besonders aus den Untersuchungen der Pawlow'schen Schule ihre Bahnen bis in die feinsten Einzelheiten. Dank der bekannten Arbeiten von Heidenhain und Langley sind wir auch weitgehend über die besondere Rolle der sekretorischen Nerven und über die Einflüsse der Blutversorgung und Vasomotoren unterrichtet. Leider fällt aber bei diesen Untersuchungen auf, daß die Grundlagen fast alle am Hunde gewonnen wurden, für die Speichelsekretion gerade kein in allen Richtungen befriedigendes Versuchstier ist. Er ist ein Karnivor und verschlingt seine Nahrung fast ungekaut in großen Bissen, so daß der Speichel für seine Verdauungsvorgänge — seine naturgemäße Nahrung ist meist schlüpfrig und gut schlingbar — nicht die Rolle spielt, die beim Menschen. Aus diesem Grunde erschien es notwendig, die Speichelsekretion und Zusammensetzung für den Menschen gesondert zu studieren. Scheuermann und Trautmann unterzogen sich bereits der Mühe, auf Grund der beim Hunde gewonnenen Ergebnisse Nachprüfungen über die Speichelsekretion von Herbivoren und Omnivoren anzustellen, die bekanntlich gut und lange kauen und die

e und voluminöse Nahrung sehr sorgfältig eingespeichelt werden muß, wie z. B. beim Pferd und Schwein der Fall ist. Auf der anderen Seite muß noch besondere Aufgaben der Speichelsekretion gedacht werden, wie es die Einhaltung des Wiederkauaktes beim Rind und Schaf andeutet. Es zeigt sich ganz deutlich, daß man leicht zu Trugschlüssen kommen kann, wenn man sich allein die Erfahrungen am Hund stützt und glaubt, diese auf andere Tiergattungen und gar den Menschen übertragen zu können. Die erste quantitative Bestimmung der Speichelasche liegt von Enderlin aus dem Jahre 1884 vor. Ihr haftet allerdings der große Fehler an, daß eine Speichelmenge analysiert wurde, die von anderen Personen zusammengemischt war. Ernährung, Gesundheitszustand und Alter sind aber für Beeinflussung der Speichelzusammensetzung so wesentliche Faktoren, daß ihre Nichtbeachtung zu unrichtigen Schlüssen führen muß. Er fand auf 100 Teile Asche berechnet:

92 %	3 basisch phosphorsaures Natrium . . . . .	28,0 %
	Chlornatrium + Chlorkalium . . . . .	61,9 %
	Schwefelsaures Natrium . . . . .	2,31 %
8 %	Phosphorsaurer Kalk	
	Phosphorsaures Magnesium	
	Phosphorsaures Eisenoxyd	

Von Enderlin werden ferner Untersuchungen von Bergelius, Bostoc, Ledermann und Gmelin und Mitscherlich angegeben, die aber eine genaue procentuale Differenzierung der löslichen Bestandteile und Mineralstoffe vermissen. Bidder und Schmidt dagegen berichten über eine Analyse von 1000 g Speichel, der aus 995,16 Teilen  $H_2O$  und 4,84 festen Bestandteilen zusammengesetzt war. Sie fanden:

1,62 Epithelien	0,43 Natron
1,34 lösliche organische Materie	0,03 Kalk
0,06 Rhodankalium	0,01 Magnesia
1,82 Anorganische Salze	0,84 Chlorkalium + Chlornatrium
0,51 Phosphorsäure	

Bei diesen Forschern wird vor allen Dingen die Menge von Kalk in der Mundspeichel angegeben.

Hier sei eine Analyse Hammerbachers aus dem Jahre 1881 angeschlossen, die Beachtung verdient.

Er fand in 100 Teilen Asche:

45,714 Kali
9,593 Natron
5,011 Kalk (und Spuren Eisenoxyd)
0,155 Magnesia
6,280 $H_2SO_4$
18,848 Phosphorsäure
18,352 Chlor
104,053 %
4,135 = abzüglich die dem Chlor äquivalente Menge O
99,918 %

Bei diesen Werten glaubt er, trotz der bei der Veraschung entstandenen Doppelbindungen, den Schluß ziehen zu können, daß die gefundenen Mengen Basen und Säuren sich gegenseitig binden. Aus dieser Berechnung findet er die nähere Zusammensetzung der Asche des gemischten Speichels.

In 100 Teilen:

Chlorkalium . . . . .	38,006
Schwefelsaures Kali . . . . .	13,908
3basisch phosphorsaures Kali . . . . .	21,278
„ „ Natron . . . . .	16,917
„ „ Kalk . . . . .	9,246
„ „ Magnesia . . . . .	0,338
	<u>99,693</u>
Überschuß an Chlor . . . . . =	0,282
	<u>99,975</u>

Die von Hammerbacher untersuchte Speichelasche enthält somit, unsichtlich nach den Gruppen der Basen geordnet:

Kalisalze . . . . .	73,192	} = 90,109 % Alkalisalze
Natronsalze . . . . .	16,917	
Alkal. Erdphosphate . . . . .	9,584	} = 9,584 % alkal. Erdphosphate
	<u>99,693 %</u>	

Jacobis Untersuchungen aus dem Jahre 1896 zeigen bereits einen deutlichen Fortschritt der Kenntnis der Speichelzusammensetzung:

1.	2.	Im Mittel :
14,46 % Chlor	13,68	14,07 % Cl
35,88 % K	35,69	35,78 % K
32,91 % Na	21,61	26,96 % Na
10,98 % Phosphor	17,70	14,34 Phosphor
Spuren $H_2SO_4$	7,1 $SO_2$	3,5 % $H_2SO_4$
2,19 % Ca	3,96	3,07 % Ca
0,407 % Mg	0,69	0,55 % Mg
<u>96,84</u>	<u>99,86</u>	<u>99,3</u>

Wenn wir nun die Enderlinsche Analyse nach unseren heutigen Gesichtspunkten unberücksichtigt lassen müssen und auch die Hammerbachs Angaben nicht ohne weiteres hinnehmen können, so bleiben als einzige uns vielleicht befriedigende Analysen, die von Jacobi aus dem Jahre 1896.

Seitdem sind quantitative Analysen des gemischten oder getrennten menschlichen Speichels meines Wissens nicht mehr durchgeführt, jedenfalls nicht veröffentlicht worden<sup>1)</sup>. Es soll Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein, diese Lücke auszufüllen und auf Grund exakter Betrachtung die Stellung der Mundflüssigkeit zu ihrer näheren Umgebung kritisch zu beleuchten. Vor allem erscheint es notwendig, einen möglichst großen Überblick über das Säure-Basen-Gleichgewicht, den Ionengehalt des Speichels und das Verhältnis der Ionen zueinander unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen zu gewinnen. Besonders wird darauf geachtet, daß der Speichel in jedem Falle auf seine wichtigsten Kationen und Anionen hin vollständig durchanalysiert wurde. Es genügte nicht, in einzelnen Fällen nur das K und Ca zu bestimmen, und ein anderes Mal vielleicht das K oder Mg, sondern es wurden von jedem Speichel bestimmt  
die Kationen: K, Ca, Mg, Na;  
die Anionen: Cl, P (als  $PO_4$ ),  $HCO_3$ , Rhodan, ferner die Wasserstoffionenkonzentration ( $p_H$ ), Kohlensäurekapazität ( $CO_2$ ) und Viskosität.

<sup>1)</sup> Die nach Abschluß der vorliegenden Arbeit erschienenen Veröffentlichungen von Knebel und Entin konnten hier nicht mehr berücksichtigt werden.



## B. Unsere heutige Kenntnis von der Zusammensetzung der getrennten Munddrüsensekrete und den Aufgaben der Speichel-Elektrolyte.

Die Gesetzmäßigkeiten über die Speichelsekretion, die sich bei den umfangreichen Untersuchungen Heidenhains (allerdings am Hunde) ergaben, haben wesentlich mittlerweile von Werther, Novi, Langley, Fletscher und Pawlow ihre Bestätigung erfahren und bilden heute die Grundlagen für alle Sekretionsprozesse, also auch für die Sekretion der Mundflüssigkeit. Nach ihnen steigt mit der Absonderungsgeschwindigkeit in der Zeiteinheit auch der Salzgehalt, d. h. je reichlicher die Sekretmenge ist, um so größer ist auch der Gehalt an anorganischen Bestandteilen. Und zwar steigt die Menge der anorganischen Bestandteile bis zu einer maximalen Grenze, die nach Heidenhain für die Submaxillaris des Hundes bei 0,5—0,6% liegt und für die Parotis desselben Tieres bei 0,4—0,5%. Diese Gesetzmäßigkeit gilt nach Grünbaum allerdings nur für normale Abflußbedingungen, während durch Einschalten eines Widerstandes, etwa in den Gang der Submaxillaris, eine relative Vermehrung des Salzgehaltes wirkt wird, so daß man geneigt sein könnte, eine Parallele mit den Tubuliertertioren der Nieren zu ziehen, die durch Rückresorption von  $H_2O$  die Konzentration des Glomerulusharnes erhöhen.

Außer diesen künstlichen Reizen sind es vor allen Dingen die physiologischen Erregungen durch die in die Mundhöhle eingeführten Stoffe, und andere auf anderen Wege des Nervensystems wirkenden Reize, die je nach der Art ganz verschiedene Sekrete erzeugen. Den Untersuchungen von Pawlow verdanken wir nun weiter unsere Kenntnis einer ganzen Reihe von Gesetzmäßigkeiten, denen die Schwankungen in der Zusammensetzung des Speichels unterliegen, und die uns einen wertvollen Hinweis für unsere Untersuchungen geben. Hier ist vor allen Dingen die heute fast allgemein gültige Anschauung nicht zu vergessen, daß es sich um eine direkte Beeinflussung der Drüsenzellen durch sekretorische Fasern handelt, die Pawlow in Anlehnung an Heidenhain in 3 Arten teilt:

1. Sekretorische Fasern, welche Absonderung von Wasser und Salzen regeln;
2. Trophische Fasern, auf welche die Anhäufung von organischen Stoffen im Speichel zurückzuführen ist;
3. Anabolische Fasern, welche sekretionshemmend wirken und die Restitution der Drüse regeln.

Wenn wir von einer genauen quantitativen Analyse zunächst absehen, so seien die folgenden nach Hammarsten unsere heutigen Kenntnisse von der Zusammensetzung der verschiedenen Drüsensekrete sowie des gemischten Speichels zusammengefaßt.

1. Submaxillaris: Bisher hat man die beiden Speichelarten, den Chorda- und Sympathikuspeichel der Submaxillaris des Menschen, nicht gesondert beobachten können, während Untersuchungen dieser getrennten Sekrete beim Hunde vorliegen. Die Sekretion erfolgt durch Kaubewegungen, psychische Vorstellungen und Reize der Schleimhaut, besonders mit sauer schmeckenden Stoffen. Organische Bestandteile: Muzin, Spuren von Eiweiß und Diastase-Enzym.



Anorganische Bestandteile: Alkalichloride, Na- und Mg-Phosphat, Ikarbonate von Alkalien und Ca, und Rhodankalium.

2. Sublingualis: Die Absonderung dieses Sekretes erfolgt ebenfalls unter dem Einfluß des cerebralen und sympathischen Nervensystems und enthält in der Hauptsache Muzin, diastatisches Enzym und Rhodankalium.

3. Mundschleim: Die Menge der nach dem Verfahren von Bidder und Schmidt abgesonderten Flüssigkeit beim Hunde war zu gering, um sie genau analysieren zu können. Er ist sehr muzinhaltig und reich an Formelementen, vor allem an Plattenepithelien, Schleimzellen und Speichelkörperchen.

4. Parotis: Die Absonderung wird reguliert teils vom Zentralnervensystem (Nervus glossopharyngeus), teils vom Sympathikus, durch psychische Einflüsse und Reizung der Drüsenerven, direkt oder reflektorisch, oder durch chemische oder mechanische Reizung der Mundschleimhaut.

Das Sekret enthält diastatisches Enzym, wenig Eiweiß und kein Muzin.

5. Gemischter Speichel: Als Produkt der verschiedenen Drüsensekrete besteht er in der Hauptsache aus Epithelzellen, Schleim- und Speichelkörperchen, oft auch Residuen der Nahrung, und diastatischem Ferment (Ptyalin).

An Mineralstoffen wurden bisher gefunden: Alkalien, Kalk, Magnesium, Eisen, an Salzsäure, Kohlensäure, Phosphorsäure und ein wenig Schwefelsäure gebunden sind. Ammoniak ist immer vorhanden, dagegen findet sich salpetrige Säure in der Regel in frischem Speichel nicht, wohl aber  $H_2O_2$ , welches alsbald aus dem Ammoniak salpetrige Säure bildet.

Diese heute noch in den meisten Lehr- und Handbüchern aufgeführten allgemein gehaltenen Untersuchungsergebnisse sind für unsere Spezialarbeit kaum zu verwerten und von zahnärztlicher Seite war wohl Pickerill der erste, der sich eingehend mit dem Speichelproblem beschäftigt hat, und dessen Arbeit für uns von grundlegender Bedeutung sind.

Er trennte zunächst bei seinen Untersuchungen die normalen Bestandteile von den anormalen und zählte:

- a) Zu den normalen:  $H_2O$ , basische Salze des Ca und Na, Kalzium- und Magnesiumphosphate, Ptyalin, Rhodankali, Natriumchlorid, Mucin;
- b) Zu den anormalen: Harnstoff, Ammoniak, Milchsäure, Leucin, Spuren von Gallensäure, Gallenfarbstoffe, Glykogen.

Des weiteren gab er auf Grund seiner experimentellen Untersuchungen eine Erklärung für die physiologische Schutzwirkung der einzelnen Speichelbestandteile:

1. Das  $H_2O$ : Zur Verdünnung und zum Abtransport der schädigenden Agenzien.
2. Das Ptyalin: Überführung von Stärke in Zucker. Durch das Vorhandensein größerer Mengen wird der Umwandlungsprozeß beschleunigt und somit die Entstehung von freier Milchsäure behindert.
3. Chloride: Na- und K-Chlorid erhöhen die Schmeckhaftigkeit der Speisen und regen die Speichelsekretion an. Dadurch erfolgt wieder eine Verdünnung und Beschleunigung der Wegschaffung der schädigenden Agenzien.
4. Phosphate verursachen:
  - a) Abbindung der Milchsäure zu unlöslichen Laktaten;
  - b) Erhärtung der äußeren Schmelzschichten.
5. Muzin: Spaltet Basen ab und muß daher als Schutzmittel angesehen werden.

Basische Salze: Ca und Na wirken neutralisierend auf Säuren. Bei fieberhaften Krankheiten ist die Sekretion meist vermindert und versagt gänzlich. (Trockenheit des Mundes und des Rachens, belegte Zunge, verminderter Geschmack u. a.) Bei akuter und chronischer Nephritis wird oft Harn in vermehrter, dem Harnstoffgehalt des Blutes entsprechender Menge ausgeschieden.

Einige Sputumaschenanalysen von Bamberger geben übersichtlich die Veränderlichkeit der Zusammensetzung des Sputums bei einzelnen Lungenerkrankungen wieder. Da das Sputum Lungenkranker neben  $H_2O$ , Mucin, Eiweiß (Albumin und Globulin) noch Fette, Kohlenhydrate, Salze und manchmal Beimengungen von Blut und flüchtigen Säuren enthält, können diese Ergebnisse für unsere Zwecke zwar nicht verwertet werden, geben aber eine wertvolle Ergänzung des bisherigen Analysenmaterials und eine Vergleichsmöglichkeit mit anderen pathologischen Prozessen.

Auf 100 g Trockensubstanz berechnet fand er:

Tabelle 1. Sputumanalysen nach Bamberger.

	Bronchitis	Bronchiektasie	Pneumonie:		Tuberkulose:	
			Entzündl. Periode	Lösungs-Periode	chronische	akute
Phosphorsäure . . . . .	40,764	35,033	37,445	47,211	35,775	33,395
Schwefelsäure . . . . .	1,246	5,611	8,371	2,617	0,701	0,801
Phosphorsäure . . . . .	10,080	13,120	Spur	1,034	13,048	14,153
. . . . .	16,163	22,496	41,198	14,634	24,066	19,986
. . . . .	30,000	30,122	14,970	37,275	27,904	31,686
Natrium . . . . .	67,176	56,828	28,236	70,558	52,626	55,043
Kalium . . . . .	—	1,309	42,827	9,062	8,106	—
Phosphorsaures Kali . . . . .	23,414	30,516	Spur	2,424	30,357	32,930
Schwefelsaures Kali . . . . .	2,709	3,508	18,230	5,698	1,528	1,743
Phosphorsaures Kali . . . . .	2,005	3,171	5,590	6,532	1,168	0,457
Phosphorsaurer Kalk . . . . .	2,437	1,534	2,108	3,961	1,627	4,322
Phosphorsaure Magnesia . . . . .	Spur	1,606	2,108	3,961	1,204	4,322
Phosphorsaures Eisenoxyd . . . . .	0,093	0,440	1,028	0,422	0,090	0,141
Phosphorsaurer u. schwefelsaurer Kalk u. Magnesia . . . . .	0,475	0,954	1,331	0,886	1,743	0,218
Schwefelsäure . . . . .	1,036	0,166	0,630	0,181	0,900	0,300
Nachschuß . . . . .	—	0,032	—	—	—	—
Rest . . . . .	0,605	—	0,020	0,266	0,651	0,584
Phosphorsaures Natron . . . . .	—	—	—	—	—	4,252

Venn es im Rahmen dieser Arbeit auch nicht möglich ist, die gesamte über das Schmelzproblem erschienene in- und ausländische Literatur erschöpfend zu behandeln, so seien doch im weiteren Verlauf bei der Abhandlung der einzelnen Schmelzkomponenten die zugehörigen und mir am wichtigsten scheinenden Arbeiten mit angeführt. Es erscheint weiter zweckmäßig, um eine möglichst klare Übersicht über die Ionenverhältnisse in der Mundflüssigkeit zu schaffen, die  $p_H$ , die Säurekapazität, Viskosität, sowie die einzelnen Kationen und Anionen kurz zu besprechen. Da sich hier bereits meine eigenen Untersuchungen anschließen, sei zunächst ausführlich eine Beschreibung der Methodik vorausgeschickt, die für alle Untersuchungen die gleiche ist.

## C. Eigene Untersuchungen.

### I. Material und Methodik.

Der zur Untersuchung gelangende Speichel stammt zum größten Teil von Patienten der Poliklinik. Zur Beobachtung der Tagesschwankungen, die Grundstein für alle weiteren Untersuchungen bildeten, stellten Angestellte der Klinik ihren Speichel freundlichst zur Verfügung, wofür ich ihnen hier bestenfalls danke. Pathologische Fälle, z. B. Stoffwechselkranke oder Patienten mit stark kariösen Gebissen, waren leider nicht zu bewegen, die lästige und sehr zeitraubende Speichelentnahme, die außerdem dauernd überwacht werden mußte, zur Bestimmung der Tagesschwankungen über sich ergehen zu lassen. Aus diesem Grunde mußte einstweilen davon Abstand genommen werden, und wir begnügten uns mit der Festlegung der Tagesschwankungen gesunder Individuen. Die übrigen pathologischen Fälle entstammen der Universitäts-Frauenklinik (Direktor Prof. Pankow) sowie der Chirurgischen und Medizinischen Klinik (Geh. Prof. Lexer und Prof. Eppinger) der Universität Freiburg i. Br., denen ich die freundliche Überweisung der Patienten hier meinen ergebensten Dank sagen möchte.

Wie wichtig es ist, sich nicht allein mit einer Messung zu irgendeiner beliebigen Zeit des Tages zufrieden zu geben, ohne Rücksicht darauf, ob das betreffende Individuum kurz vorher gegessen, geraucht oder viel gesprochen hat, beweisen die Ergebnisse der Tagesschwankungen (Kurve Nr. 15). Auf der anderen Seite ist es nicht gleichgültig, ob der Speichel morgens nach dem Aufstehen nüchtern entnommen wird oder zu einer ganz bestimmten und für alle Untersuchungen generell festgesetzten Zeit. Auf Grund meiner Untersuchungen ergibt sich nämlich die unbedingte Notwendigkeit, grundsätzlich den „Ruhespeichel“ von dem „Reizspeichel“ zu trennen. Und zwar möchte ich unter „Ruhespeichel“ den Speichel verstanden wissen, der bei einem ruhenden Individuum längere Zeit von der Wirkung von Nahrungsreizen — und zwar mindestens 2—3 Stunden nach erfolgter Nahrungsaufnahme — ohne besondere vorangegangene Mundreinigung die Mucosa bedeckt, während auf der anderen Seite unter „Reizspeichel“ jenejenige Art von Mundflüssigkeit zusammengefaßt werden soll, deren Zusammensetzung nach unseren bisherigen Erfahrungen durch irgendwelche lokale, chemische oder psychische Reize infolge verschiedener Innervation des den Speicheldrüsen versorgenden Nervensystems, beeinflußt werden kann. Eine derartige Abhängigkeit zeigte sich schon ganz zu Beginn unserer Untersuchungen, wenn wir das Individuum, das den Speichel lieferte, veranlaßten, während der Speichelentnahme heftige Schluckbewegungen auszuführen und zu gähnen. Es zeigte sich dann, daß diese Reflexe genügten, um einen wesentlichen Unterschied in der quantitativen Zusammensetzung herbeizuführen (Tab. 2).

Daraus ergab sich die Notwendigkeit besonderer Vorsicht bei der Speichelentnahme, die stets genau überwacht wurde, so daß auch durch unnötiges Saugen um evtl. die Entnahme zu beschleunigen — Fehlerquellen nach Möglichkeit vermieden wurden. Daß es natürlich gänzlich unstatthaft ist, den Speichel mehrerer Personen zusammenzugießen und zu analysieren, wie das ebenfalls in früheren Arbeiten gemacht wurde, braucht wohl nicht besonders betont zu werden.



Wir verfahren so, daß wir die Personen, deren Speichel analysiert werden sollte, mit den genauen Anweisungen versehen und sie zur Entnahme um 5 Uhr mittags bestellten. Diese Zeit wurde ganz allgemein durchgehalten, denn die Änderungen der H-Ionenkonzentration zeigten um diese Zeit die konstantesten Werte, während die Nüchternwerte außerordentlich stark variierten<sup>1)</sup>. Die vorherige Mundspülung wurde unter allen Umständen vor der Entnahme des entstehenden Reizes vermieden, außerdem wäre die Möglichkeit nicht

Tab. 2. Wirkung von Schluck- und Gähnreflexen auf die Elektrolytausscheidung.

	Ruhespeichel	Speichel nach Gähnen und Schlucken
	mg %	mg %
K . . . . .	58,76	64,61
Ca . . . . .	9,12	11,40
Na . . . . .	84,87	94,99
Mg . . . . .	1,07	1,54
Cl . . . . .	37,54	37,54
CNS . . . . .	29,60	29,60
PO <sub>4</sub> . . . . .	4,60	3,60
HCO <sub>3</sub> . . . . .	79,00	79,00
PH . . . . .	7,18	7,45

geschlossen, daß einige Tropfen retinierten Wassers in der Mundhöhle imstande sind, die zur Untersuchung benötigten kleinen Speichelmengen merklich zu vergrößern und das Resultat zu verschieben. In diesem Zusammenhange darf nicht betont werden, daß die Vorschriften für exakte physiologisch-chemische Analysen auf das genaueste befolgt wurden. Besondere Beachtung wurde der Reinigung und Sterilisation der Glaswaren geschenkt, was bei Reihenuntersuchungen manchmal wegen der Kürze der zur Verfügung stehenden Zeit auf große Schwierigkeiten stieß. Erst nach vollständiger Beherrschung der Analysentechnik<sup>2)</sup> und nach mehreren hundert Vorversuchen, die sich immer auf 5—10 Paarsuntersuchungen von Lösungen bekannten Inhalts erstreckten, wurde zu den Vorversuchen übergegangen, von denen etwa die ersten 50 ebenfalls aus Sicherheitsgründen nicht verwertet wurden, weil die Veraschung sowie der starke Salzgehalt mancher Speichelsorten die Arbeit anfänglich sehr erschwerten.

Nach Abschluß dieser Arbeit erschien ein Bericht von Knoche „Über den Ionengehalt des Speichels und seine Beziehungen zur Zahnkaries“, der in der Hauptsache die Nüchternwerte für die stets bereitwillige Mundspülung untersucht hat. Meinem Erachten nach sind diese Ergebnisse verwertbar, wenn die absoluten „Ruhespeichelwerte“ zum Vergleich herangezogen werden. Es scheint mir um so wichtiger, als entweder durch Gärungsvorgänge während der Nacht ein Reiz, der durch das vorherige Mundspülen erzeugt wird, die Zusammensetzung des Speichels wesentlich beeinflußt wird.

Es sei mir hier gestattet, dem ersten Assistenten des Physiologisch-Chemischen Institutes des Basler Instituts (Direktor: Prof. Dr. Spiro) Herrn Dr. Tschopp meinen aufrichtigsten und herzlichsten Dank für die stets bereitwillige Hilfe bei der Arbeit zu sagen. Durch sein freundliches Entgegenkommen wurde es mir ermöglicht, mich im Basler Institut in die Bestimmungsmethoden, die nicht nur für das Blutserum Anwendung fanden, einzuarbeiten und sie nach seinem Vorschlage auch für Speichel zu verwerten. Bei den vielen Schwierigkeiten, die sich anfänglich in der analytischen Technik ergaben, hat mir Herr Dr. Tschopp mit seinen langjährigen Erfahrungen in diesem Gebiet stets bereitwilligst seine Zeit geopfert und mir mit Rat und Tat auch bei der Auswertung der Ergebnisse zur Seite gestanden.



Die Entnahme des gemischten Speichels erfolgte in ganz einfacher Weise, indem das betreffende Individuum den Kopf nach vorn überfallen und bei geöffnetem Mund den Speichel durch einen sterilen Glastrichter in ein Reagenzglas tropfen ließ. Durch Paraffinöl wurde dafür gesorgt, daß Verdunstungsvorgänge, insbesondere der Kohlensäure verhindert wurden oder Verunreinigungen von außen nicht eintraten. Von jeder Person wurde ein genauer Mundstatus sowie das Alter und die Ernährungsart aufgenommen, um evtl. später Beziehungen zu der Speichelzusammensetzung feststellen zu können.

Da es sich in den früheren Arbeiten außerordentlich störend bemerkbar machte, daß die Analysenwerte nicht einheitlich angegeben werden, soll die Berechnung nach der heute in der Medizin üblichen Form erfolgen. Infolgedessen werden die Ergebnisse in Milligramm-Prozent ausgedrückt, d. h. wenn in 100 ccm Mundflüssigkeit z. B. 42,53 mg Kalium enthalten sind, wird dies mit 42,53 mg % angegeben.

## II. Bestimmung physiologischer Standardwerte und experimentelle Untersuchungen.

### a) Wasserstoffionen-Konzentration.

Zunächst interessierte nun, mittels genauer heute üblicher Bestimmungsmethoden an einem größeren Material die Reaktion der Mundflüssigkeit in den Altersstufen kennen zu lernen, die bekanntlich sehr verschieden ist, um die Gründe festzulegen, die für die außerordentlich starke Variabilität der Reaktion maßgebend sind. Ohne auf die sehr umfangreiche Literatur dieses Gebietes im einzelnen eingehen zu können, die von Türkheim ausführlich zusammengestellt wurde, sei im folgenden der Stand unserer heutigen Forschung zusammengefaßt, sowohl für den Biologen als auch den Praktiker von nicht zu unterschätzender Bedeutung ist.

Ursprünglich bediente man sich zur Ermittlung der Speichelreaktion der Titrationsmethode, die darauf beruhte, daß man zu einer alkalischen resp. basischen Speichelmenge, die auf ihren Gehalt an Laugen bzw. Säuren geprüft werden sollte, bis zum Neutralpunkt eine entgegengesetzt reagierende Flüssigkeit von bekannter Titerstellung hinzufügte. Durch diese Titration wurden aber nur die im Augenblick wirksamen oder „aktuellen“ Ionen bestimmt, sondern nicht die Summe der „aktuellen und potentiellen“ Ionen, die nichts darüber aussagen kann, wie sauer der Speichel in Wirklichkeit ist. Aus diesem Grunde ging man dazu über, die aktuellen Ionen allein zu bestimmen, wozu einerseits die elektrometrische Messung der H-Ionen und andererseits die Farbindikatorenmethode ausgearbeitet wurde.

Für wissenschaftliche Zwecke hat die Indikatorenmethode, wegen geringerer Genauigkeit, der Bestimmung mit der Gaskette immer mehr weichen müssen und von den verschiedenen elektrometrischen Meßmethoden haben sich ihrerseits wieder einzelne Spezialmethoden herausgebildet, die erfahrungsgemäß die besten Resultate lieferten. Zu ihnen gehört die Messung mittels der Wasserstoffelektrode mit stehender Gasblase sowie der Chinhydronelektrode nach Bijlmann in bestimmten Fällen, in denen  $p_H$  kleiner ist als 8,5. Von diesen beiden letzten Methoden

ns die Messung mit der Chinhydronelektrode als ganz besonders brauchbar  
 xakt erwiesen, sodaß damit der größte Teil unserer Messungen ausgeführt

ährend nun in den älteren Angaben der Literatur der Speichel im allgemeinen  
 kalisch gehalten wurde, weil er nämlich nach der Titrationsmethode gemessen  
 häuften sich mit der Einführung der modernen Meßmethoden auch Angaben  
 neutralen, leicht sauren bis stark sauren Speichel, und dieses hatte wieder  
 olge, daß man erneut einen Zusammenhang zwischen Mundspeichel und  
 ystem suchte, ohne aber bisher eine einheitliche Gesetzmäßigkeit finden zu  
 n. Zunächst lag es natürlich nahe, die Methoden für die Speichelreaktions-  
 mungen auf ihre Brauchbarkeit hin zu untersuchen und sodann Grenz- und  
 erte festzulegen. Auch diese von den verschiedensten Seiten publizierten  
 en zeigten den Übelstand, daß man sich nicht auf einer gemeinsamen Basis  
 e und den Speichel stets unter denselben Bedingungen maß, was dazu führte,  
 a einzelnen Fällen sehr wichtige Faktoren unberücksichtigt blieben, und

Tabelle 3.

chwankungen der Wasserstoffionenkonzentration der getrennten Drüsen-  
 sekrete.

Zeit der Speichelentnahme	Parotis-Speichel: $p_H$	Sublingualis-Speichel: $p_H$	Gemischter Speichel: $p_H$
6° nachm.	5,638	5,701	6,866
10° „	5,420	6,213	7,022
12° nachts	5,317	5,666	7,026
9° vorm.	5,227	5,770	6,460
11° „	6,576	6,597	6,748
3° nachm.	5,321	5,518	6,913
6° „	6,109	6,397	7,069

der außerordentlichen Variabilität des Speichels ein sehr buntes Bild  
 nd. So kam es, daß die verschiedensten Grenz- und Mittelwerte neben-  
 er erschienen. Aus diesem Grunde ergab sich die Notwendigkeit, die  
 le der außerordentlichen Schwankungen näher zu untersuchen.

e Angaben Lüschers, die durch meine Analysen und Experimente zum  
 re Bestätigung fanden, zeigen, daß hauptsächlich die Kohlensäurespannung  
 alb der Mundhöhle für die Änderung der Reaktion verantwortlich zu  
 n ist, und daß es sich offenbar um das Ineinandergreifen mehrerer wichtiger  
 se handelt.

nächst scheint die Kohlensäure der Ein- und Ausatemungsluft einen wichtigen  
 t darzustellen, denn wenn man bei Messungen der Wasserstoffionenkonzen-  
 t zu verschiedenen Zeiten desselben Tages die  $CO_2$ -Spannung in vitro  
 risch entnommenem Speichel konstant hält und den Speichel mit ihr ins  
 gewicht bringt, so findet man, daß die sonst bei direkten Messungen auf-  
 den sehr erheblichen Tagesschwankungen wegfallen und die  $p_H$ -Werte auf  
 sogar auf Wochen absolut konstant bleiben. Allerdings treten von Zeit  
 t geringe Schwankungen auf, die meinem Erachten nach auf Verschiebung  
 ure-Basen-Gleichgewichts zurückgeführt werden müssen, wie wir es überall  
 rganismus finden.

Wie ich weiter zeigen konnte, ist für die Beurteilung der Reaktion des gemischten Speichels die Bestimmung der H-Ionenkonzentration der getrennten Drüsensekrete von größter Bedeutung. Durch die Feststellung nämlich, daß die Reaktion des Parotispeichels in fast allen Fällen unter dem Neutralpunkt, also auf saurem Gebiet liegt und ferner der Sublingualspeichel meist alkalisch reagiert, wäre immerhin die Vorstellung möglich, daß die Wasserstoffionenkonzentration des gemischten Speichels das Resultat des einfachen Mischungsverhältnisses beider Sekrete darstellt (Tab. 3).

Wie aus der Tabelle hervorgeht, liegen aber die Werte des gemischten Speichels ganz außerhalb der Parotis- und Sublingualiswerte, und zwar meistens nach der alkalischen Seite hin. Auch in vitro fand diese Annahme keine Bestätigung, in den allerwenigsten Fällen stellte sich bei der Mischung des sauren Parotispeichels mit dem alkalischen Sublingualspeichel ein Mittelwert ein. Hier mag vielleicht die Kohlensäure eine wichtige Rolle spielen, die das Muzin kolloidchemisch aufzulösen oder sich mit dem Eiweiß chemisch umsetzt. Durch die Mischung des sauren

Tabelle 4. Einfluß des Muzins auf die Wasserstoffionenkonzentration der getrennten Drüsensekrete.

Direkte Messung der Wasserstoffionen-Konzentration:		$p_H$ = nach Zusatz von:						
		1 ccm H <sub>2</sub> O	1½ ccm H <sub>2</sub> O	2 ccm H <sub>2</sub> O	1 ccm Muzin	1½ ccm Muzin	2 ccm Muzin	
		$p_H$	$p_H$	$p_H$	$p_H$	$p_H$	$p_H$	
Parotis-Speichel	{ A. $p_H$ = 6,777	6,725	6,725	6,787	6,797	6,797	6,715	Muzin + Toluol
	{ B. $p_H$ = 7,126	7,034	—	7,050	6,576	—	6,883	Muzin ohne Toluol
Gemischter Speichel	{ A. $p_H$ = 7,126	7,036	—	7,038	7,080	—	7,119	Muzin + Toluol
	{ B. $p_H$ = 7,680	7,360	7,355	7,124	7,166	7,306	7,130	Muzin ohne Toluol
Sublingualis-Speichel	{ A. $p_H$ = 6,970	—	—	—	6,969	—	6,937	Muzin + Toluol
	{ B. $p_H$ = 7,302	7,113	7,152	6,868	6,921	6,835	6,950	Muzin ohne Toluol

Parotis- und alkalischen Sublingualspeichels wird jedenfalls die Lösung der H-Ionen ärmer, so daß dadurch die alkalischen Werte hervorgerufen werden.

Da es bei der Entnahme der getrennten Sekrete den Eindruck erweckt, als ob das Muzin von den Watterollen nicht aufgenommen würde, da der ausgeschiedene Speichel in den meisten Fällen keinen fadenziehenden, sondern meist tropfenden Charakter zeigte, wurde der Einfluß des Muzins auf die  $p_H$  der getrennten Sekrete ermittelt (Tab. 4).

Zu diesem Zweck wurde in der Versuchsanordnung folgendermaßen verfahren. Eine größere Menge stark muzinhaltigen Speichels wurde in einem Falle mit Toluol im anderen ohne Toluolzusatz dialysiert, der Rückstand in bestimmten Mengen mit frisch entnommenem Speichel zugesetzt und die H-Ionenkonzentration vor und nachher gemessen. Wie aus der beigegebenen Tabelle zu ersehen ist, wird die Speichelreaktion durch den Muzinzusatz, wenn die Bakterien durch Toluol in ihrer Wirksamkeit geschädigt sind, so gut wie gar nicht verändert, während im anderen Falle die Wasserstoffionenkonzentration zum Teil erheblich zunimmt, d. h. die Kohlehydratgruppen des Muzins zerfallen während der Zeit der Dialyse durch Bakterienwirkung in Milchsäure, CO<sub>2</sub> und Wasser und ändern die Reaktion des Speichels nach der sauren Seite.



um einen besseren Überblick über das Verhältnis der Wasserstoffionen-  
konzentration zum Eiweißgehalt zu bekommen, wurden Bestimmungen des  
Gesamtstickstoffes, sowie des Reststickstoffes von mehr und weniger muzin-  
reichem Speichel nach Kjeldahl durchgeführt.

Tabelle 5. Eiweißgehalt und Wasserstoffionenkonzentration des Speichels.

Rest-Stickstoff mg%	Gesamt-Stickstoff mg%	Gesamt-Stickstoff minus Rest-Stickstoff	× Eiweiß Faktor	mg% Eiweiß	pH
118,7	1568,0	1449,3		= 9130,6	7,366
80,0	1650,0	1570,0		= 9891,0	7,509
230,0	2000,0	1770,0		= 11151,0	6,969
175,0	2100,0	1825,0		= 11497,5	6,869
130,0	2000,0	1870,0	× 6,3	= 11781,0	7,055
150,0	2200,0	2050,0		= 12915,0	7,012
143,0	2800,0	2657,0		= 16739,1	6,755
210,0	3550,0	3140,0		= 19782,0	6,149
184,0	3800,0	3616,0		= 22780,8	6,539
189,0	4250,0	4061,0		= 25584,3	6,683

Wenn es sich hier auch nur um wenige Untersuchungen handelt, so ist doch  
daraus zu ersehen, daß in den Fällen von besonders niedrigen Gesamt-  
Reststickstoffwerten die Wasserstoffionenkonzentration ebenfalls sehr gering ist,  
im Gegensatz dazu sehen wir in den Fällen 7—10, bei denen es sich um stark  
konzentrierten Muzin- und Eiweißgehalt infolge Gravidität und dadurch bedingten  
niedrigen Gesamt- und Reststickstoffgehalt handelt, die höchsten H-Ionenkonzentra-  
tionswerte.

Die Bestimmung des Rest- und Gesamtstickstoffs erfolgte nach dem von Kjeldahl an-  
gegebenen Mikroverfahren. Und zwar beruht das Prinzip der Methode darauf, daß bei der  
Bestimmung des Gesamtstickstoffs sämtlicher Stickstoff aus Eiweiß, Eiweißabbauprodukt sowie  
aus sonstigen organischen Stickstoffverbindungen durch Veraschen mit konzentrierter Schwefel-  
säure unter Zusatz eines Katalysators (Ca-Salz) in Ammoniak umgewandelt wird, welches von  
überschüssigen Schwefelsäure als Ammoniumsulfat gebunden wird. Durch Zusatz einer  
überschüssigen Menge Alkali wird das Ammoniak in Freiheit gesetzt und in eine titrierte Schwefel-  
säure hineindestilliert. Durch Titration wird dann die Menge des übergegangenen Ammoniaks  
daraus die Menge des Stickstoffs ermittelt.

**Durchführung der Bestimmung:** Zu 1 ccm Speichel werden 9 ccm Aqua dest., 1 ccm  
konzentrierte Schwefelsäure und einige Tropfen Kupfersulfatlösung hinzugesetzt. Sodann erfolgt Ver-  
dampfung bis zur Klarheit der Flüssigkeit mit Glasperlen unter dem Abzug (1—1½ Stunde).  
Abkühlung mit etwas Aqua dest. auffüllen und in eine Vorlage von 10 ccm 1/70 n HCl-Lösung  
einige Tropfen Methylrot überdestillieren. Danach wird mit etwas Aqua dest. nachgespült  
und gegen eine 1/70 n NaOH-Lösung titriert.

**Berechnung:** Werden z. B. von den in der Vorlage befindlichen 10 ccm HCl 6,2 ccm durch  
Natriumcarbonat zurücktitriert, so erhält man das Ergebnis des Stickstoffs auf 100 ccm Speichel berechnet,  
man 10,0 — 6,2 = 3,8 mit 10 multipliziert = 38 mg%.

Die Bestimmung des Reststickstoffs weicht nur insofern von dem vorstehenden Verfahren  
ab, als vor dem Veraschen enteiweißt wird. Und zwar werden 5 ccm Speichel mit 15 ccm Aqua  
dest. und 5 ccm 1,6 % Uranylacetat gut umgeschüttelt und filtriert. Von dem Filtrat werden dann  
5 ccm in ein Kjeldahl-Glas pipettiert, 1 ccm konz. H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und einige Tropfen Ca-Lösung hinzu-  
gegeben und mit Glasperlen 1—1½ Stunden, wie bei der ersten Bestimmung, verascht.

Am letzten Endes mögen vielleicht auch nach Lukomsky endogene Einflüsse  
wie zum Beispiel von Tonusänderungen und Reizung des vegetativen Systems die Reaktion  
des Speichers auf bestimmte Art verändern. Es geht jedenfalls aus allen bisher in sehr  
großem Umfange vorliegenden Messungen der Wasserstoffionenkonzentration



der Mundflüssigkeit hervor, ganz gleich welche Bestimmungsmethode angewendet wurde, daß die Resultate ganz außerordentlich stark variieren.

So werden z. B. Maximalwerte der  $p_H$  von 5,25 (Pohle), 5,7 (van den Broek), 5,8 (Broderick) bis 8,3 (Foa), 8,4 (Broderick), 8,5 (Andresen) u. a. angegeben und in den meisten Fällen Durchschnittswerte errechnet, die meinem Erachtens nach für die biologische Auswertung nicht immer brauchbar sind. Es hat immer wieder gezeigt, daß wir mit der Errechnung von Durchschnittswerten weiterkommen, sondern versuchen müssen, durch biometrische Auswertung größerer statistischen Materials, unter Ausschaltung größerer subjektiver Fehler, uns einen Überblick über die feineren Zusammenhänge zu verschaffen. Ich bin daher nahe, dies zunächst an einer größeren Gruppe gleichaltriger Kinder unter gleichen Lebens- und Ernährungsbedingungen zu studieren. Zu diesem Zweck wurden 225 Schulkinder herangezogen, deren Speichel etwa 2—3 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme als „Ruhespeichel“ mit der Chinhydronelektrode gemessen wurde. Wie aus der Tab. 1 im Anhang zu ersehen ist, finden wir den Durchschnitt für die einzelnen Altersstufen  $p_H$ -Werte, die nahe dem Neutralpunkt liegen, und zwar meistens etwas nach der sauren Seite hin.

Zur besseren Übersicht werden die Werte dieser Tab. 1 graphisch zur Darstellung gebracht (Fig. Nr. 6).

Aus dem Verlauf der Kurve 6 geht hervor, daß die Wasserstoffionenkonzentration des Speichels im jugendlichen Alter sich wesentlich von der älteren Individuen unterscheidet, und zwar finden sich bei 120 untersuchten Stadtkindern, die gleichmäßig in 3 Altersklassen eingeteilt sind, die alkalischeren Werte durch bei den 6- und 7jährigen, während mit zunehmendem Alter die Wasserstoffionenkonzentration ebenfalls zunimmt, d. h. der Speichel saurere Werte zeigt. Auffallend ist sogar, daß die einzelnen Kurven fast nahezu parallel laufen; sie geben einen wichtigen Aufschluß über Alter und Speichelveränderung, und wie nachfolgend noch gezeigt werden soll, kann auf Grund dieser Untersuchungen eine Beziehung zur Kariesfrequenz und Viskosität geschlagen werden.

Eine weitere wichtige Tatsache ist aus der Kurve 7 abzulesen.

Die Werte der Kurve 7 sind aus der Tab. 2 des Anhangs zu ersehen.

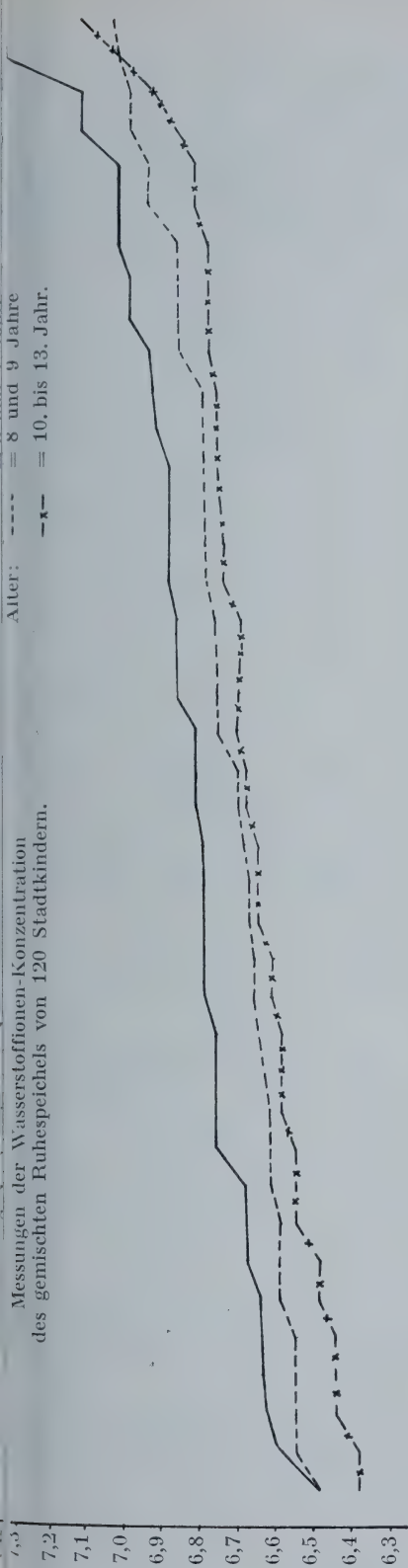
Es zeigt sich nämlich beim Vergleich der H-Ionenkonzentration des Speichels von Kindern aus verschiedenen Ortschaften, in denen zum Teil auch verschiedene Ernährungsbedingungen vorliegen, daß die alkalischeren Werte, d. h. die Werte, die dem Neutralpunkt am nächsten liegen, in dem Ort zu finden sind, wo auch die intakteren und besser gepflegten Gebisse fanden. Vielleicht kann auf Grund hierfür die planmäßige Schulzahnpflege angeführt werden, die sich auf diesen Ort von Freiburg aus mit erstreckt.

Weitere systematische Untersuchungen über die Reaktion des Speichels in größerem Umfange bei älteren Personen sind im Gange. Diese dürften vielleicht weitere wichtige Aufschlüsse geben. Heute schon können wir sagen, daß zwar die Durchschnittswerte um den Neutralpunkt herum liegen, aber im allgemeinen starke Abweichungen zeigen.

Wenn wir von dem statistischen Material zunächst einmal absehen und die speziellen Ergebnisse der H-Ionenkonzentration betrachten, so können wir feststellen (Tab. 14), daß die Nüchternwerte, wie auch Strebingers

Messungen der Wasserstoffionen-Konzentration  
des gemischten Ruhespeichels von 120 Stadtkindern.

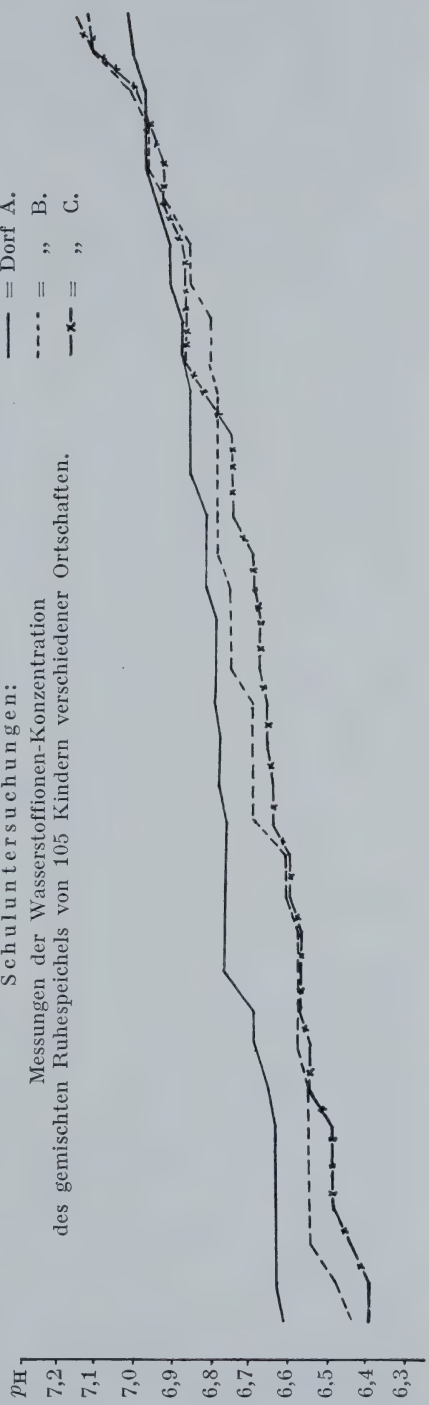
Alter: --- = 8 und 9 Jahre  
-x- = 10. bis 13. Jahr.



Nr. 7. Reihe von je 35 Kindern verschiedener Ortschaften und verschiedenen Alters der pH-Größe nach geordnet.

Schuluntersuchungen:  
Messungen der Wasserstoffionen-Konzentration  
des gemischten Ruhespeichels von 105 Kindern verschiedener Ortschaften.

— = Dorf A.  
--- = „ B.  
-x- = „ C.



meistens sauer sind. Dann aber verliert der Speichel, offenbar beeinflusst durch verschiedensten Reize, seinen sauren Charakter, um sich etwa 2—3 Stunden nach letzten Nahrungsaufnahme um den Neutralpunkt zu halten. Irgendwelche Gemäßigkeit in der Änderung der H-Ionenkonzentration durch die Nahrung und andere exogene in der Mundhöhle tätigen Faktoren wurden nicht festgestellt. Tagesschwankungen der  $p_H$  sind zum Teil sehr erheblich, auch zeigen die Werte, die an verschiedenen Tagen zur selben Zeit gemessen wurden, große Unterschiede.

Wie sind nun alle diese Beobachtungen biologisch auszuwerten? Könnte man daraus Zusammenhänge mit pathologischen Veränderungen innerhalb der Mundhöhle erkennen oder nicht? In diesem Zusammenhang sei auf Grund vorliegender Untersuchungen auf das im Brennpunkt des Interesses stehende Problem der Zahnsteinbildung hingewiesen, das neuerdings von Näslund wieder aufgenommen wurde. Auf Grund seiner Untersuchungen kommt er zu dem Schluß, daß gewisse Mundbakterien (*Actinomyces* und *Leptothrix*) Kalk aus dem Speichel auszufällen imstande sind und bei ihrem Wachsen zu biochemischen Vorgängen Veranlassung geben, die zu einer Senkung der Wasserstoffionenkonzentration führen. In den ausgefallenen Kalksalzen sollen sowohl beim supra- wie beim subgingivalen Zahnstein in den festen Vegetationen aufgenommen werden können, die diese Mikroorganismen auf der Zahnoberfläche bilden. Die Senkung der H-Ionenkonzentration steht gewöhnlich als Folge der proteolytischen Wirksamkeit der Mikroorganismen. Die diastatische hingegen soll eine umgekehrte Wirkung zur Folge haben, nämlich eine vermehrte Wasserstoffionenkonzentration und damit auch gesteigerte Löslichkeit für die Löslichkeit von Salzen. Er zieht daraus die Schlußfolgerung, daß der Speichel, der beim Verlassen der Drüse nicht zuckerführend ist, in der Nähe des Drüsenausführungsganges in den wenigsten Fällen saurer Gärung unterliegt, so daß hier die Mikroorganismen die beste Möglichkeit finden, durch Proteolyse eine Verringerung der H-Ionenkonzentration herbeizuführen, um dadurch die Ausfällung von Kalksalzen zu bewirken.

Aus meinen früheren Untersuchungen ergab sich die sehr wichtige Tatsache, daß wir es bei den einzelnen Sekreten einmal mit einer sauren Lösung (Parotis + Speichel) zu tun haben und daneben mit einer alkalischen (Sublingualis + Submaxillaris + Speichel!). Diese Lösungen treffen in der Mundhöhle zusammen und werden gleichzeitig von der Kohlensäure der In- und Expirationsluft umspült. Es ist höchstwahrscheinlich, daß allein schon durch die Mischung der beiden Lösungen die Lösung an H-Ionen ärmer wird und dadurch die Kalksalze zur Ausfällung gebracht werden. Der Ort der Mischung und Ausfällung ist aber vorwiegend am Boden der Mundhöhle, und so mag vielleicht die altbekannte Beobachtung eine Erklärung finden, daß auf der lingualen Seite der Frontzähne am häufigsten der supra-gingivale Zahnsteinansatz zu finden ist.

Ferner wird uns hier in erster Linie das Studium des Kalziumstoffwechsels weiterbringen und uns Aufschluß über die näheren Bedingungen der Kalkausfällung aus dem Speichel in Verbindung mit H-Ionenkonzentrationsänderungen geben können. Die Auffindung der negativ geladenen, durch positive Adsorption adsorbierbare Ca-Verbindung im Speichel, sowie der Nachweis leicht löslicher Ca-Salze in den meisten heute gebräuchlichen Zahnpasten und Pulvern (Herbol, Knecht und Becks) weisen hier schon einen Weg.



## b) Viskosität.

Die Feststellung, daß eine Beeinflussung der Speichelreaktion also nicht die Kohlensäure der Ein- und Ausatemluft allein, sondern durch verschiedene andere Faktoren zu erfolgen scheint, von denen in der Hauptsache Muzin und die Eiweißkörper als Puffersubstanzen bereits genannt wurden, te zu systematischen Viskositätsmessungen, die sehr interessante Ergebnisse

en. Gerade im Rahmen der Karies- und Parodontosenfrage scheint die Viskosität Beachtung zu finden. Für die Größe der Viskosität ist in erster Linie der Gehalt des Speichels an Muzin mitbestimmend, das heute von vielen Seiten als fördernd angesprochen wird. Hyperviszider Speichel soll die Retention von Bakterien in den Approximalräumen der Zähne fördern und auf diese Weise wesentlich zur Entstehung der Erosionen an den Zahnhälsen beitragen. In seiner zartartigen Konsistenz finden die meisten Mundorganismen einen Zufluchtsort, wo sie sich üppig vermehren können. Ferner werden weiche Speisereste durch das Muzinhäutchen an ihrem Platz gehalten. Durch die Möglichkeit, daß sich an diesen Stellen Kalk und andere Salze niederschlagen, wodurch es zur Bildung von Zahnstein kommt, scheint eine große Gefahr für das Zahnsystem zu liegen, weshalb die Untersuchung des Viskositätsgrades des Speichels mit besonderer Beachtung der Kariesfrequenz aus diesem Grunde gerechtfertigt erschien.

Speichelviskositätsmessungen sind meines Wissens nur von Pickerill, Macnacci und in neuerer Zeit von Eisenberg ausgeführt worden.

Für die Ausflußgeschwindigkeit einer Flüssigkeit aus einer Kapillare sind drei Arten von Reibungsverlusten maßgebend, und zwar die äußere Reibung der Flüssigkeit an der Gefäßwand infolge seiner Adhäsion und die innere Reibung der Flüssigkeitsteilchen untereinander. Die letztere wird mit Viskosität bezeichnet. Da sich von der Viskosität zahlenmäßig eine Vorstellung machen zu können, sind für mehrere Methoden und Apparaturen angegeben worden, von denen sich das große Laboratoriumviskosimeter nach Prof. Dr. Hess, Zürich, besonders bewährt hat, und das allen Anforderungen auf Genauigkeit und Handlichkeit nachzukommen ist.

Das Prinzip der Messung liegt darin, daß in zwei parallel montierten Kapillaren, die bis zu einer 0-Marke mit Speichel bzw. Aqua dest. gefüllt sind, diese beiden Flüssigkeiten über einer Skala langsam gleichzeitig angesogen werden. Erreicht der Speichel nach einem bestimmten Abstand die Marke 1, so wird der Stand des Aqua dest. - Meniskus abgelesen. Das Viskosimeter gibt also nur den relativen Viskositätswert des Speichels, den sog. „Viskositätskoeffizienten“ an und der gelesene Wert besagt, wieviel mal größer die Viskosität des zu untersuchenden Speichels gegenüber Aqua dest. als Einheit ist. Der Viskositätskoeffizient wird ferner durch das Poiseuillesche Gesetz bestimmt. Für ihn gilt die Gleichung:

$$\frac{\eta_x}{\eta_a} = \frac{p_x \cdot t_x}{V_x} \cdot \frac{V_a}{p_a \cdot t_a} \cdot \frac{K_x}{K_a}$$

wo  $V$  = Durchflußvolumen;  $p$  = Druck;  $t$  = Durchflußzeit;  $\eta$  = Viskosität.  $K$  sind die verschiedenen Faktoren, die im Versuch konstant gehalten werden, zusammengefaßt.



Hierbei sind alle Größen, die sich auf den zu untersuchenden Speichel beziehen, mit dem Index  $x$  versehen, und mit dem Index  $a$  die Größen, die sich auf das Aqua dest. beziehen. Da nun aber der Druck, der das Strömen der beiden Flüssigkeiten verursacht, derselbe ist, weil die beiden Kapillaren kommunizieren, ist der Druck:

$$\frac{p_x \cdot l_x}{p_a \cdot l_a} = 1.$$

Ferner wird das Durchflußvolumen des Wassers als Einheit angenommen, so daß für den Viskositätskoeffizienten die Formel gilt:

$$\frac{\eta_x}{\eta_a} = V_a \cdot \frac{K_x}{K_a}.$$

Mittels dieser Methode wurden nun größere Reihenuntersuchungen vorgenommen, die ausführlich in einer Dissertation von Möller zusammengefaßt wurden. Sowohl in Freiburg als auch in den benachbarten Schwarzwaldorten wurde bei 225 Kindern im Alter von 4—15 Jahren der Speichel auf seine Viskosität hin gemessen, um physiologische Standardwerte zu schaffen und an einem größeren Untersuchungsmaterial Beobachtungen über die Zusammenhänge zwischen Viskosität und Karies, ferner Viskosität, Alter und Karies anzustellen.

Auf Grund der erhaltenen Viskositätswerte von Kindern mit vollständig intaktem Gebiß und guter Mundpflege beträgt die Viskosität des „Ruhespeichels“ im Mittelwert = 1,4.

Zur Beantwortung der eingangs erwähnten Frage, ob durch die Viskositätsmessung eine einwandfreie Beziehung zur Kariesfrequenz abgeleitet werden kann, wurde auf Grund des aufgenommenen Mundstatus ein Kariesindex festgelegt. Bei den 225 Kindern wurden insgesamt 6140 Zähne untersucht, von denen 1111 = 18,2% kariös waren. Wenn diese 18,2% auf das einzelne kindliche Gebiß übertragen werden, so ergibt sich daraus, daß 5 Zähne von 25, 26, 27 oder 28 Zähnen übertragen werden, so ergibt sich daraus, daß 5 Zähne als Vergleichsgröße kariös sein dürfen und die Vergleichsgröße 5 nehmen wir als Einheit mit der Bezeichnung Kariesindex = 1. Finden sich nun in einem Gebiß weniger oder mehr kariöse Zähne als 5, so ändert sich der Kariesindex entsprechend.

Aus den statistischen Erhebungen geht aber hervor, daß sich der Durchschnittsviskositätswert = 1,4 nicht allein bei vollständig intakten Gebissen findet, sondern von den 225 verschiedenen Arten von Speichel insgesamt in 106 Fällen, d. h. in der Hälfte sämtlicher Analysen, die Viskosität zwischen 1,2 und 1,6 = 1,4 liegt, ohne Rücksicht auf den Kariesindex von 0,2—2,2 und ferner weitere 100 Zähne zwischen 1,7 und 3,2 = 2,45; daraus geht hervor, daß wir als Durchschnittsviskositätswert für den Ruhespeichel allgemein den Wert zwischen 1,4 und 1,9 ansehen müssen, der dem Kariesindex 1 gleichgesetzt wird.

Wie verhält es sich nun mit den Beziehungen der Viskosität zur Karies? Die nachstehende Zusammenstellung zeigt, wie die Viskositätsdurchschnittswerte für die verschiedenen Kariesindizes verteilt sind.

Daraus ergibt sich kein unmittelbar abzulesender Zusammenhang, denn nur würdigerweise zeigt diese Aufstellung, daß der Durchschnittsviskositätswert für die Kariesindizes 0 — 1 = 2,17 derselbe ist wie für die Kariesindizes 1,2—

der Tab. 3 im Anhang ist zu ersehen, wie oft die einzelnen Viskositätswerte den verschiedenen Indizes vertreten sind. Diese erhöhten Viskositätswerte 2,17 kommen allein durch die einzelnen stark erhöhten Werte zustande, die bei der Festlegung der Normalwerte nicht berücksichtigt wurden. Bei den Untersuchungen kam man nämlich auf erhebliche technische Schwierigkeiten, da die Kinder in verschiedenen Ortschaften die Zeit, zu der sie zum letzten Male etwas gegessen hatten, nicht präzise angaben. Auf diese Weise konnte es vorkommen, daß kurz vorher in der Unterrichtspause durch eine Tasse Milch, einen Apfel oder eine

Kariesindex	Viskosität	
0	1,38	} = Viskosität = 2,17
0,2	2,30	
0,4	2,15	
0,6	2,16	
0,8	2,30	
1,0	1,96	
1,2	2,10	} = Viskosität = 2,17
1,4	1,78	
1,6	2,09	
1,8	2,41	
2,0	1,44	
2,2	1,52	
2,4	3,36	
2,6	2,70	

als ein Sekret produziert wurde, das weit die oben als normal bezeichneten Werte überschritt, manchmal einen Viskositätswert von 5,7 erreichte und sogar offensichtlich wegen allzu großer Zähigkeit überhaupt nicht mehr gemessen werden konnte. Es handelt sich dann also nicht mehr um „Ruhespeichel“, sondern um ausgesprochenen „Reizspeichel“, der hier für uns nicht in Frage kommt.

Wie groß diese Schwankungen sein können, geht aus den Angaben von Pickel hervor, der die Speichervisikosität 5 Minuten nach Genuß von verschiedenen Mitteln maß (zit. nach Türkheim). Er benutzte eine andere Bestimmungs-  
methode:

$$\text{Speichervisikosität} = \frac{\text{Durchströmungssekunden v. 1 ccm Speichel}}{\text{Durchströmungssekunden v. 1 ccm Aqua dest.}}$$

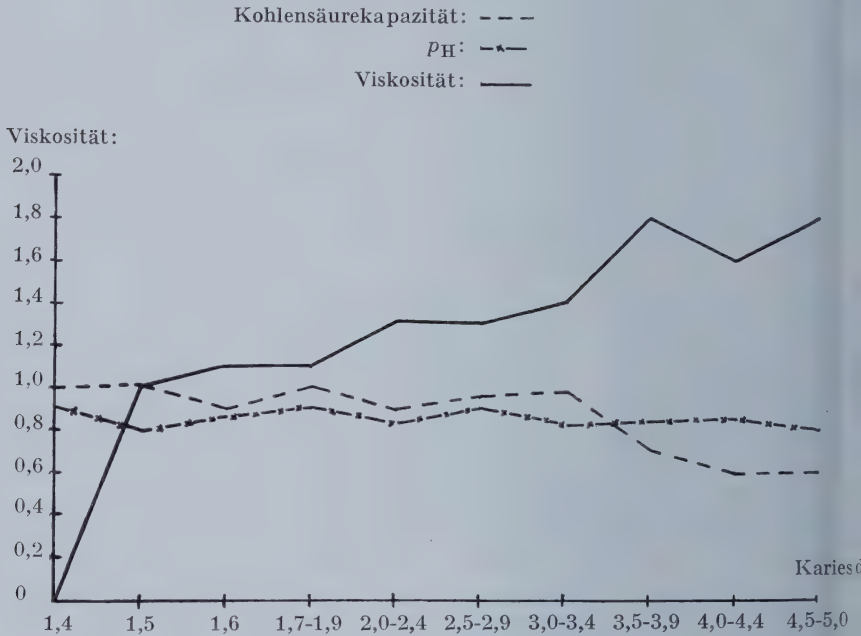
Normaler Speichel (Durchschnitt). . . . .	14,2
Nach Äpfeln . . . . .	22,5
Nach Orangen . . . . .	25,5
Nach saurem Mundwasser . . . . .	12,3
Nach Rohrzucker . . . . .	34,1
Nach Salzlösung . . . . .	6,6.

er Rohrzucker liefert also den am meisten und Salz den am wenigsten viskösen Speichel, und es ist ferner daraus zu ersehen, wie außerordentlich wichtig es ist, bei der Feststellung der Normwerte, soweit wir davon überhaupt sprechen können, den Ruhespeichel zu verwenden. Da wir aber nicht ohne weiteres berechtigt sind, die hohen Werte aus diesen Überlegungen heraus ganz zu streichen, schon allein deswegen nicht, weil die hohen Kariesindizes auch tatsächlich in manchen Fällen erhöhte Viskosität aufweisen, müssen wir diese in die Statistik mit einbringen.

In der Kurve 8 sind nun auf der Abszisse die Viskositätswerte und auf der Ordinate der betr. Kariesindex eingetragen, und wir sehen daraus ganz eindeutig, daß, wenn wir versuchen die Einzelwerte graphisch darzustellen (ohne Mittelwerte zu errechnen, was hier nicht zum Ziele führt), *bei zunehmender Viskosität auch die Kariesfrequenz steigt und damit dem Muzin, als dem Hauptträger, eine unbestreitbar schädigende Wirkung für das Zahnsystem zugesprochen werden muß.*

Und weiter können wir sagen, daß, wenn bei den Kindern in diesen Schwarzortsgemeinschaften die Kariesfrequenz gegenüber den Stadtkindern weit ausgesprochen ist, mit gleichzeitig erhöhten Viskositätswerten, dem Muzin oder der Klebrigkeit des Speichels zwar nicht allein ohne weiteres die Schuld gegeben werden kann,

Nr. 8. Wasserstoffionen-Konzentration, Viskosität, Kohlensäurekapazität des Speichels und Zahnkaries.



aber immerhin auf die Ernährungsweise geachtet werden muß, durch die dauernd ein muzinhaltiger Speichel produziert wird. Hier sei auf die Arbeit Schnitzler verwiesen, in der bei der Nachforschung der Ursachen, die zu außerordentlich schlechten Zahnverhältnissen in Bahlingen führten, festgestellt wurde, daß gerade in dieser Gemeinde eine Unsitte sehr stark verbreitet ist, welche erfahrungsgemäß auf die Zähne einen schädigenden Einfluß ausübt. Die Kinder bekamen von klein auf bei jeder Gelegenheit Zuckerwerk und feine Backwaren. Diejenigen, welche die Kinderschule besuchen, bringen im Vesper Weizenbrot mit, das mit einer Mischung von Rahm und Zucker bestrichen ist. Außerdem bringen die Kinder für die Zeit, die sie sich in der Schule halten, mehrere Stücke Zucker mit, so daß ihr Speichel nicht nur ständig gelblich Zucker enthält, sondern dadurch auch ein stark hyperviszider Speichel sezerniert



l, der nicht geeignet ist, als Spülflüssigkeit dafür zu sorgen, daß die Inter-  
alräume dauernd von Speiseresten gesäubert werden, sondern den Zucker in  
er feinsten Verteilung an den Zähnen festhält, so daß eine Vergärung überall  
Munde stattfindet und durch die Bildung von Milchsäure zur Schädigung des  
nsystems beiträgt.

Eisenberg teilt mit, daß die durch diesen übermäßigen Genuß von Süßig-  
en und auch durch Durst verursachte Zunahme der Viskosität des Speichels  
h Trinken einiger Schluck Wasser, das mit etwas schwachsaurem Fruchtsaft  
etzt ist, sofort wieder beseitigt werden kann.

Im nun gleichzeitig einen Überblick zu erhalten, in welcher Weise sich die  
und Kohlensäurekapazität zu den gefundenen Viskositätswerten bei Kindern  
hält, wurden für diese ebenfalls Vergleichsgrößen errechnet, und zwar ergab  
für den Ruhespeichel ein Mittelwert für

die Wasserstoffionenkonzentration = 7,0

Kohlensäurekapazität . . . . . = 0,21

eres ist aus der Dissertation Möller zu entnehmen.

Die Kurve 8 zeigt das weitere sehr wichtige Ergebnis: Mit zunehmender  
kosität des Speichels nimmt die Wasserstoffionenkonzentration zu  
Speichel wird saurer) und das Kohlensäurebindungsvermögen ab.

### c) Kohlensäurekapazität.

Wir sehen also, daß die Wasserstoffionenkonzentration in Verbindung steht  
dem Kohlensäurebindungsvermögen des Speichels, und zwar erfolgt, ähnlich  
im Blute, die Neutralisation der in den Speichel gelangenden Säuren in der  
ptsache durch  $\text{NaHCO}_3$ . Diese Säuren, die nun von außen in die Mundhöhle  
igen können oder durch diastatische Wirksamkeit der Mikroorganismen als  
hsäure im Munde entstehen, vielleicht auch gleich bei der Drüsensekretion  
otis) mit ausgeschieden werden, werden an das Natrium des  $\text{NaHCO}_3$  gebunden,  
es findet also eine Veränderung des Kohlensäurebindungsvermögens statt.  
a von van Slyke angegebene Verfahren zur Bestimmung der Kohlensäure-  
azität des Blutes (Bestimmung der Alkalireserve) wurde für die Untersuchung  
Speichels angewandt.

In bestimmtes Quantum Speichel wird mit Kohlensäure (Ausatemungsluft) gesättigt und  
vakuum entgast. Aus der abgelesenen Kohlensäuremenge wird berechnet, wieviel Alkali  
peichel zur Bindung von Säuren vorhanden war<sup>1)</sup>.

Die Berechnung des Bikarbonatgehaltes erfolgt in der Weise, daß man von der abgelesenen  
al die das Volumen der ausgeschiedenen Kohlensäure angibt, eine Durchschnittskorrektur  
0,12 für Temperatur und Druck abzieht und die  $\text{CO}_2$  bindende Flüssigkeit des Speichels  
er hierfür zusammengestellten Tabelle abliest<sup>2)</sup>. Auf diese Weise erhält man die Anzahl  
ukzentimeter  $\text{CO}_2$  auf 0° und 760 mm Quecksilber reduziert, die als Bikarbonat in 100 ccm  
peichel gebunden sind.

Venn wir zunächst von der Alkalireserve des Körpers ausgehen, so schließt  
ie das Alkali aller Puffer des Blutes und der Gewebe ein, das innerhalb phy-  
ogischer  $p_{\text{H}}$ -Bezirke nutzbar gemacht werden kann, um Säuren zu neutralisieren.  
ie Puffer sind hauptsächlich die Alkalisalze der Kohlensäure und der Proteine.

<sup>1)</sup> Eine sehr gute Übersetzung des amerikanischen Originaltextes findet sich im Handbuch  
log. Arbeitsmethoden von Abderhalden 1924, Abt. 4, Teil 4, Heft 4, 4. Lieferung, S. 194.  
Angabe in Mandel-Steudel, Minimetrische Methoden der Blutuntersuchung, S. 60.



## Zusammensetzung des gemischten „Ruhespeichels“

Tabelle 9.

Nr.	Alter	Zeit der Entnahme, ? Min.	Anzahl d. ccm Speichel in dieser Zeit	Wann zuletzt gegessen	Menge Sp. pro Stunde „ Tag	CO <sub>2</sub> = HCO <sub>3</sub> ccm = mg%	p <sub>H</sub>	m
1	8	10,15 <sup>0</sup> —11,15 <sup>0</sup> 60 Min.	14 ccm	7 <sup>0</sup> morg.	14 ccm 336 „	0,35 92,2	7,142	61
2	13	10 <sup>0</sup> —11 <sup>0</sup> 60 Min.	15 „	7 <sup>0</sup> „	15 „ 360 „	0,36 94,8	6,928	40
3	13	10,30 <sup>0</sup> —11,30 <sup>0</sup> 60 Min.	17 „	7 <sup>0</sup> „	17 „ 408 „	0,35 92,2	7,027	40
4	14	10,30 <sup>0</sup> —11,20 <sup>0</sup> 50 Min.	21 „	7 <sup>0</sup> „	25,5 „ 612 „	0,4 105,3	7,350	63
5	14	10,30 <sup>0</sup> —11,30 <sup>0</sup> 60 Min.	20 „	7 <sup>0</sup> „	20 „ 480 „	0,38 100,0	6,995	65
6	15	3,15 <sup>0</sup> —4,10 <sup>0</sup> 55 Min.	14 „	12 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> Mit- tagessen	15,2 „ 364,8 „	0,4 105,3	7,221	59
7	17	11,15 <sup>0</sup> —11,50 <sup>0</sup> 35 Min.	16 „	9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> morg.	27,4 „ 657,6 „	0,3 79,0	7,147	58
8	20	10,40 <sup>0</sup> —10,55 <sup>0</sup> 15 Min.	16 „	8 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> „	64 „ 1536 „	0,35 92,2	7,116	44
9	21	10,50 <sup>0</sup> —11,25 <sup>0</sup> 35 Min.	14 „	8 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> „	24 „ 576 „	0,4 105,3	7,522	47
10	21	12,00 <sup>0</sup> —12,35 <sup>0</sup> 35 Min.	14 „	9 <sup>0</sup> „	24 „ 576 „	0,35 92,2	7,164	58
11	24	11,30 <sup>0</sup> —12,15 <sup>0</sup> 45 Min.	15 „	9 <sup>0</sup> „	60 „ 1440 „	0,3 79,0	7,038	50
12	24	11,30 <sup>0</sup> —12,05 <sup>0</sup> 35 Min.	15,5 „	9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> „	26,6 „ 640,4 „	0,3 79,0	6,900	48
13	26	10,00 <sup>0</sup> —10,50 <sup>0</sup> 50 Min.	9 „	12 <sup>0</sup> nachts	10,8 „ 259,2 „	0,38 100,1	7,257	59
14	28	10,10 <sup>0</sup> —10,40 <sup>0</sup> 30 Min.	30 „	7 <sup>0</sup> morg.	60 „ 1440 „	0,3 79,0	7,061	50
15	30	12,20 <sup>0</sup> —12,50 <sup>0</sup> 30 Min.	—	9 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> „	36 „ 864 „	0,35 92,2	7,119	50
16	31	11,30 <sup>0</sup> —12,20 <sup>0</sup> 50 Min.	16 „	7,45 <sup>0</sup> „	14,2 „ 468,8 „	0,35 92,2	6,975	56
17	36	10,45 <sup>0</sup> —11,45 <sup>0</sup> 60 Min.	10 „	7 <sup>0</sup> „	10 „ 240 „	0,38 100,1	7,283	60
18	40	10,15 <sup>0</sup> —10,50 <sup>0</sup> 35 Min.	15 „	8 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> „	22,2 „ 532,8 „	0,35 92,2	7,123	63

er physiologisch normalen Verhältnissen.

Tabelle 9.

a %	Mg mg%	Na mg%	Cl mg%	CNS mg%	P mg% = PO <sub>4</sub> mg%	Mittelwerte
33	1,34	69,46	72,23	29,6	5,1 15,61	HCO <sub>3</sub> = 95,14 1,56
90	1,03	76,59	65,35	47,6	5,1 15,61	P <sub>H</sub> = 7,11
28	0,98	71,18	58,47	27,5	4,9 15,00	K = 54,23 1,39
28	1,25	78,20	65,35	34,8	4,89 15,00	Ca = 11,94 0,29
80	1,68	68,42	72,23	32,0	5,51 16,86	8.—20. Lebensjahr Mg = 1,27 0,05
52	1,34	71,64	72,23	29,6	4,57 13,99	Na = 70,63 3,07
20	0,90	60,72	72,23	32,2	3,26 9,98	Cl = 68,79 1,94
19	1,69	68,88	72,23	32,2	3,4 10,41	CNS = 33,20 0,57
53	2,55	70,38	72,23	37,0	3,1 9,39	PO <sub>4</sub> = 14,06 0,24
50	1,13	65,55	65,35	37,0	—	HCO <sub>3</sub> = 89,02 1,46
70	1,44	64,51	—	27,5	3,9 11,94	P <sub>H</sub> = 7,14
82	1,17	41,86	—	32,0	4,1 12,55	K = 54,66 1,39
90	1,21	73,83	85,94	27,6	5,4 16,53	Ca = 11,81 0,29
23	1,43	78,20	65,35	14,8	4,1 12,55	20.—40. Lebensjahr Mg = 1,36 0,05
56	1,02	51,63	78,01	20,8	3,09 9,39	Na = 65,99 2,87
04	0,75	65,55	72,23	30,7	3,15 9,46	Cl = 61,30 1,73
09	1,27	68,42	72,23	32,0	4,8 14,69	CNS = 29,58 0,51
71	1,68	76,59	79,11	36,3	3,9 11,94	PO <sub>4</sub> = 12,05 0,21

Nr.	Alter	Zeit der Entnahme, ? Min.	Anzahl d. ccm Speichel in dieser Zeit	Wann zuletzt gegessen	Menge Sp. pro Stunde „ Tag	CO <sub>2</sub> =HCO <sub>3</sub> ccm mg %	p <sub>H</sub>	F mg
19	49	9,30 <sup>0</sup> —10,30 <sup>0</sup> 60 Min.	15 ccm	7 <sup>0</sup> morg.	15 ccm 360 „	0,4 105,3	7,585	60
20	53	9,25 <sup>0</sup> —10,15 <sup>0</sup> 50 Min.	—	7 <sup>0</sup> „	—	0,4 105,3	7,427	65
21	55	9,15 <sup>0</sup> —9,50 <sup>0</sup> 35 Min.	17 „	7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> „	29,1 „ 698,4 „	0,4 105,3	7,342	54
22	58	9,45 <sup>0</sup> —10,10 <sup>0</sup> 25 Min.	15 „	7 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> „	36 „ 864 „	0,32 84,3	6,870	62
23	60	10,15 <sup>0</sup> —11,05 <sup>0</sup> 50 Min.	11 „	8 <sup>1</sup> / <sub>2</sub> <sup>0</sup> „	13,2 „ 316,8 „	0,4 105,3	7,204	60
24	71	11,15 <sup>0</sup> —12,00 <sup>0</sup> 45 Min.	14 „	8 <sup>0</sup> „	18,6 „ 546,4 „	0,3 79,0	6,897	57
Mittelwerte des normalen Ruhespeichels:						HCO <sub>3</sub> 93,16	p <sub>H</sub> 7,15	F 55
Zum Vergleich: Durchschnittszahlen des menschlichen Blutes:						130,0	7,25	20

Während nun van Slyke und Cullen zeigen konnten, daß die Puffer im Gewebe in ständiger Bewegung sind, mehrmals so viel Säure zu neutralisieren, als die Puffer im Blut, wie es ja infolge der viel größeren Masse der Gewebe auch zu erwarten ist, spiegelt jedoch das Blut im Wechsel seines Säure-Basen-Gleichgewichts, was das beständige Austausches seiner diffundierbaren Ionen mit denen der Gewebe das des ganzen Körpers wieder. Festgesetzte normale Grenzen der Alkalireserve existieren nur unter begrenzten Bedingungen, denn es kommen erhebliche physiologische Abweichungen häufig vor, z. B. kann starke Milchsäureproduktion in wenigen Minuten die Alkalireserve um die Hälfte des Ruhewertes verringern.

Vom Speichel, als typischem Sekretionsprodukt, dürfen wir nicht ohne weiteres dieselben Verhältnisse erwarten. Eine gewisse Abhängigkeit von der Alkalireserve und der Reaktion des Blutes müßte allerdings unter richtigen Entnahmeverhältnissen vorhanden sein. Bereits die Ergebnisse der Untersuchungen Strömberg über die H-Ionenkonzentration des Speichels und des Blutes zeigen, daß die p<sub>H</sub> des Speichels eher dem H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-Gehalt als der p<sub>H</sub> des Blutes parallel läuft.

Sobald der Speichel die Drüsenausführungsgänge verläßt, unterliegt er, wie wir gesehen haben, den mannigfaltigsten Einflüssen und es ist verständlich, daß sich auch das Säure-Basen-Gleichgewicht sowohl durch eine endogene Beeinflussung als auch durch die Nahrungsaufnahme, Vergärungsprozesse und den sich dauernd ändernden Kohlensäurespannungen fortgesetzt verschiebt.

Es wurden umfangreiche Bestimmungen des Kohlensäurebindungsvermögens vorgenommen, die, wie bereits bei den Schuluntersuchungen erwähnt wurde, zeigten, daß mit abnehmender Kohlensäurekapazität die Wasserstoffionenkonzentration und ebenfalls die Kariesfrequenz ganz eindeutig zunimmt. i

setzung.

Ca g%	Mg mg%	Na mg%	Cl mg%	CNS mg%	P mg%	PO <sub>4</sub> mg%	Mittelwerte
66	1,40	73,83	79,11	32,4	4,3 13,16		HCO <sub>3</sub> = 97,44 1,59
09	1,16	79,35	85,99	20,5	5,4 16,53		P <sub>H</sub> = 7,22 K = 60,20 1,54
80	1,17	76,59	79,11	27,6	5,1 15,61		Ca = 13,96 0,35
66	1,07	73,94	85,99	29,2	3,7 11,32	40.—71. Lebensjahr	Mg = 1,17 0,05 Na = 76,26 3,32
47	1,32	79,35	85,99	27,9	5,9 18,12		Cl = 83,69 2,39
09	0,94	74,52	85,99	41,3	5,8 17,76		CNS = 29,81 0,51 PO <sub>4</sub> = 15,41 0,28
13	1,29	69,88	74,68	30,90		PO <sub>4</sub>	
0	2,0	325,0	363,9	—		12,2	

ematische Untersuchung aller Altersstufen zeigt weiter, daß im jugendlichen (8.—20. Lebensjahr), s. Tab. 9, das Kohlensäurebindungsvermögen, als Carbonat berechnet, größer ist (95,14 mg%) als im mittleren Lebensabschnitt (92 mg%), dagegen in vorgeschrittenem Alter wieder ansteigt und eine durchschnittliche Höhe von 97,44 mg% erreicht. Außerdem ist aus den hohen Carbonatwerten, die gleichzeitig mit einer alkalischeren Speichelreaktion einhergehen, ersichtlich, daß freie Kohlensäure vorhanden sein muß.

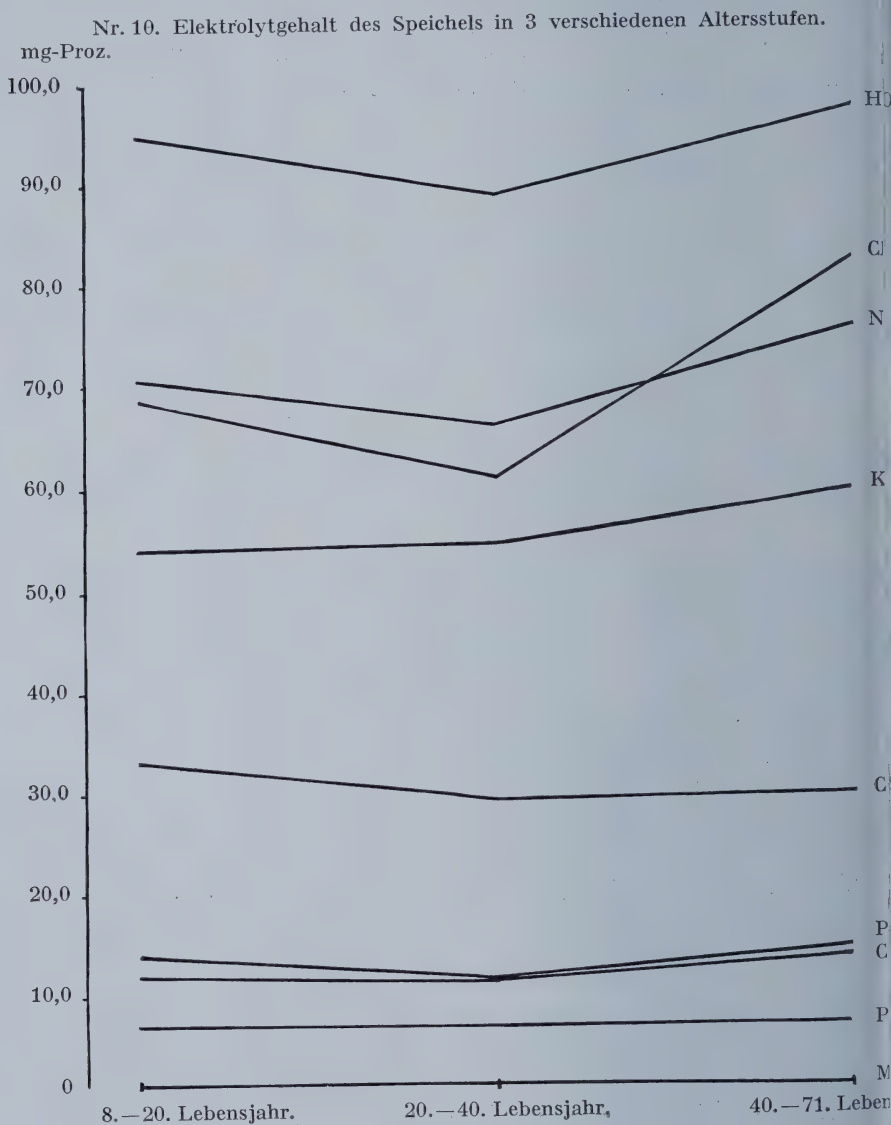
Wenn wir also mit zunehmender Kariesfrequenz eine Abnahme der Kohlenhydratekapazität antreffen, so müßte man eigentlich glauben, daß die im Munde lokalisierte Milchsäure, die stets als entkalkender Faktor bei der Entstehung von Zahnkaries angegeben wird, die Alkalireserve mit beeinflußt. Die Menge der lokalisierten Milchsäure würde nur sehr gering und lokalisiert anzutreffen sein, was zwar an den verschiedenen Vergärungsstationen, d. h. in den Interdentalräumen und kariösen Höhlen. Es würden daher Beziehungen zwischen quantitativ bestimmter Milchsäure im Speichel und der H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> mit Wahrscheinlichkeit nur bei Personen mit stark vernachlässigtem und kariösem Gebiß nachzuweisen sein. Auf der anderen Seite zeigen die Untersuchungsergebnisse von Schmitz und Kometska, daß in den Speicheldrüsen Milchsäure und Phosphorsäure liefernde Prozesse stattfinden, deren Art man bei dem heutigen Stand der Kenntnisse über den Gaswechsel in den Drüsen nichts Besonderes entnehmen kann.

#### d) Kationen.

Wenn wir nun zur Betrachtung der gesamten Ionenverhältnisse im gemischten Speichel“ übergehen, so mag die Tab. 9 zunächst einen Überblick über die



Verteilung der Anionen und Kationen geben. Zur näheren Erläuterung wurden die Speichelentnahmezeiten, das Alter des betr. Individuums sowie die Uhrzeit der letzten Nahrungsaufnahme mit eingetragen. Aus den produzierten Speichelmengen wurde die Menge Speichel pro Stunde und Tag berechnet. Schon hier soll die



hingewiesen werden, daß es nicht statthaft ist, wie Türkheim es bei seinen Untersuchungen macht, die Berechnungen auf einen Zeitnenner zu bringen, d. h. die verschiedenen Kationen und Anionen dürfen nicht in Milligramm-Prozenten und St. ausgedrückt werden, weil die Schwankungen der einzelnen Größen künstlich bedeutender gemacht würden. Die errechneten Mittelwerte am Boden der Ta

en das arithmetische Mittel aller Analysen dar, während diese seitlichen Mittelwerte die Altersstufen 8—20, 20—40 und 40—70 Jahre getrennt berechnet wurden. Im den Überblick über die Tab. 9 zu erleichtern, sei eine graphische Darstellung geschlossen, die ein außerordentlich interessantes Ergebnis zeigt (Fig. Nr. 10). *Man sieht zunächst ganz allgemein daraus, daß im mittleren Lebensalter, also zwischen 20 und 40 Jahren, mit Ausnahme des Kaliums, das von Jugend ständig zunimmt, die Ausscheidung der Kationen und Anionen nachläßt, um sich mit zunehmendem Alter wieder stark anzusteigen.* Auf die nähere Deutung der Kurven wird bei den einzelnen Elementen noch eingegangen werden; im übrigen sei in diesem Zusammenhang auf die Tab. 4 des Anhangs verwiesen, in der die einzelnen Zahlenergebnisse der Tabelle der Größe nach geordnet sind. Die 3 Horizontalen teilen die Ergebnisse in die beiden äußeren Viertel und in die beiden inneren (oder mittleren Viertel), und die Maße, welche diese Gruppen abgrenzen, geben einen völlig hinlänglichen Ausdruck für die Variation. Im übrigen sei auf die Auswertung nach biometrischen Grundsätzen in den Abschnitten 5—8 des Anhangs verwiesen.

### 1. Kalzium.

Von den Kationen interessierte in erster Linie das Kalzium, dessen Wirkungen auf den allgemeinen Stoffwechsel für den Gesamtorganismus seit Jahren im Vordergrund wissenschaftlicher Forschung stehen. Die bis heute noch nicht eindeutig geklärten Vorgänge bei der Verknöcherung, das Problem der Rachitis und anderer Knochenerkrankungen gaben Veranlassung zu eingehenden Analysen des Blutserums, und die neueren Arbeiten von Klinker, die sich in der Hauptsache mit den physikalisch-chemischen Bedingungen des Lösungszustandes und des Transportes des Kalziums im Körper befassen, weisen einen neuen Weg für die Beurteilung der Vorgänge in der Mundhöhle sich abspielenden Prozesse.

Das Kalzium bildet, wie wir wissen, mit 2 Anionen des Speichels,  $\text{CO}_3$  und  $\text{PO}_4$ , schwerlösliche Salze und der gelöste Anteil dieser schwerlöslichen Salze zerfällt nach den Untersuchungen von Nernst bis auf einen geringen konstanten Rest in seine Ionen zerfallen. Das „Löslichkeitsprodukt“ stellt das Produkt der Konzentrationen der beiden Ionen dar, das stets konstant bleibt, so daß aus dieser Konstanten und der Konzentration des einen Ions die des anderen berechnet werden kann. Für  $\text{CaCO}_3$  hat Rona und Takahashi die bekannte Rona-Gleichung aufgestellt, und es wird das Löslichkeitsprodukt des  $\text{CaCO}_3$  durch die Gleichung bestimmt:

$$[\text{Ca}] [\text{CO}_3] = \text{Konst.} = L_p \text{ (Löslichkeitsprodukt).}$$

Durch Einsetzen des aus der 2. Dissoziationskonstanten der Kohlensäure,  $\text{H}^+$ -Konzentration und der Bikarbonatkonzentration berechneten Wertes

$$\frac{[\text{H}]}{[\text{H}_2\text{CO}_3]} = k_2$$

das Löslichkeitsprodukt folgt dann

$$\frac{[\text{Ca}] \cdot [\text{HCO}_3]}{[\text{H}]} = \frac{L_p}{k_2} = \text{(Rona-Konstante).}$$

Aus diesen beiden leicht bestimmbaren Größen und einer Konstanten ist die Kalziumkonzentration ohne weiteres zu berechnen: Es beträgt der ionisierte

Anteil des Kalziums im Serum nach Ronas Untersuchung etwa 2,5 mg%, während man im menschlichen Serum durchschnittlich etwa 10 mg% Gesamtkalzium findet. Infolgedessen ist neben dem berechneten ionisierten Anteil noch etwa 7 mg% Lösung vorhanden, das sich nicht im Lösungsgleichgewicht befindet. Von den 7 mg% Ca soll nach den Ergebnissen der Kompensationsdialyse etwa 3,5 mg% weiß gebunden sein. Vorliegende Beobachtungen führten dazu, diesen Zustand als einer übersättigten Lösung aufzufassen (Mond und Netter, Holt und Mitarbeiter).

Aus verschiedenen experimentellen und theoretischen Gründen, auf die unten näher eingegangen wird, mußte aber für das Serum eine Übersättigung an  $\text{CaCO}_3$  oder  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  ausgeschlossen werden, und es zeigten sich in den mir angestellten Untersuchungen annähernd dieselben Bedingungen im menschlichen Speichel.

Parallel mit einer Vermehrung des Ca im Blut nach Injektion oder Fütterung erfolgt eine erhöhte Kalziumausscheidung durch die Speicheldrüsen, und zwar das Doppelte der Durchschnittsziffern, um sich nach wenigen Stunden wieder auf den alten Spiegel einzustellen, d. h. im Blute gäbe es eine übersättigte Lösung, die durch die Drüsentätigkeit und erhöhte Ausscheidung evtl. wieder ausgeglichen werden könnte. Schüttelversuche des Serums mit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  bzw.  $\text{CaHPO}_4$  nach denen von Mond und Netter, Holt, La Mer und Chown angestellt wurden, ergaben, daß das im Serum gelöste Ca sich verminderte, während  $\text{CaCO}_3$  keinen Erfolg nicht hatte, obwohl doch die Lösung sowohl an Karbonat wie Phosphat übersättigt sein sollte. Die Analysen Klinkes, der die Verminderung des Ca nach dem Schütteln mit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  nachprüfte, zeigten merkwürdigerweise, daß diese Verminderung nicht auf einer Ausfällung von  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  sondern größtenteils von  $\text{CaCO}_3$  beruhte. Durch die Arbeiten Heubners angeregt, der die Wirkung fein disperser Substanzen bei Einspritzung in die Blutbahn von Katzen beobachtete und z. B. bei intravenösen Ca-Salzinjektionen das eigenartige Bild der Tetanislähmung feststellte, das in verstärktem Maße durch gleichzeitige Injektion von Phosphatgemischen, ja sogar  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  in Substanz und feinst disperser Suspension aller Art erzeugt werden konnte, wurden von Klinker nun Versuche in der Richtung angestellt, daß Serum mit allen möglichen Adsorptionsmitteln geschüttelt wurde, um zu sehen, ob das betreffende Adsorptionsmittel dieselbe Wirkung hat, wie  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  und zwar positiv adsorbierend.

Es zeigte sich, daß  $\text{Al}(\text{OH})_3$ ,  $\text{BaSO}_4$  und  $\text{Mg}(\text{NH}_4)\text{PO}_4$  genau so wirkten wie  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , daß aber Kaolin und Kohle wirkungslos sind. Auf Grund dieser Untersuchungen muß es sich im Serum um eine bisher unbekannte Bindung des Ca handeln, die Klinker als eine „negativ geladene, vermutlich kolloidale Calciumbindung“ anspricht, die nach den Ergebnissen der Ultrafiltration zum Teil mit Eiweiß oder andere kolloide Substanzen adsorbiert ist.

Bei den Schüttelversuchen, die ich mit gemischtem menschlichen Speichel + Kalziumkarbonat und Kalziumphosphat anstellte, zeigte es sich, daß die Wirkung von Klinker im Blut aufgefundene negativ geladene adsorbierbare Verbindung im menschlichen Speichel unter physiologischen Verhältnissen ebenfalls vorhanden ist (Tab. 11).

Es geht daraus hervor, daß das  $\text{CaCO}_3$  auf das Kalzium des Speichels keinen fallenden Einfluß hat, wie dies ebenfalls für das Serum übereinstimmend

ed, Netter, von Hastings und Mitarbeitern und Klinker angegeben wird, aber die Analyse nach dem Schütteln mit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  eine Verminderung des zeigt und eine Erhöhung des P um etwa das Doppelte. Hier im Speichel sind die Verhältnisse also ähnlich zu liegen wie im Blut. Und wenn es sich

Tabelle 11.

	Speichel nativ mg%	Geschüttelt mit:	
		$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ mg%	$\text{Ca CO}_3$ mg%
Nr. 1	Ca = 8,90 P = 3,60	5,58 7,20	8,89 3,59
Nr. 2	Ca = 7,874 P = 4,46	3,81 10,3	7,874 4,46

den Berechnungen im Blut wie im Speichel um eine an  $\text{CaCO}_3$  übersättigte handeln soll, so sind diese Ergebnisse damit nicht in Einklang zu bringen. Ergebnisse der Schüttelversuche stimmen außerdem mit denen Tschopp's überein, der sowohl Galle wie auch das Dialysat dieser Galle mit  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$   $\text{CaCO}_3$  schüttelte und ebenfalls diese für die Pathogenese vieler Krankheiten richtige dialysable Verbindung in der menschlichen Galle vorfand, während im Harn fehlt.

Um das Lösungsverhältnis des Kalziums näher zu klären, wurde die Ultrafiltration und Dialyse herangezogen, nach denen sich wie nach der berechneten bestimmten Menge an ionisiertem Ca die Verteilung des Ca in den Körperflüssigkeiten wie folgt darstellt:

Tabelle 12.

Verteilung des Ca in den Körperflüssigkeiten, ausgedrückt in mg% (Klinker).

	Serum	Gewebs- flüssigkeit	Liquor 2	Galle	Milch	Speichel [Becks]
Menge . . . . .	10—12	10	5—6	10—30	150	ca. 10—12
ionisiert (Fraktion 1) .	2	2	2	0,2	1—2	2
unlöslich . . . . .	6—7	nicht bekannt	alles	8—30	7—10	6—7
Schub über d. echt ionisierten Teil (Fraktion 2) .	4—5	„	3—4	8—30	5—8	4—5
weiß gebund. (Fraktion 3)	4—5	„	0	?	140	?

Die Speichelwerte wurden auf Grund sehr zahlreicher Untersuchungen gefunden und stellen Mittelwerte dar.

Die Analysen des Ca erfolgten nach der von Kramer und Tisdall angegebenen Methode:

Der unverdünnte Speichel wird nach dem Zentrifugieren mit Ammoniumoxalatlösung versetzt. Das vorhandene Ca, das hierbei als Kalziumoxalat ausfällt, wird sodann mit Ammoniumacetat gut ausgewaschen, mit  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zersetzt und die freigewordene Oxalsäure mit einer Permanganatlösung titriert.

Die Ausführung der Bestimmung erfolgt in der Weise, daß man zu 2 ccm Speichel 2 ccm dest. und 1 ccm gesättigte Ammoniumoxalatlösung hinzufügt, gut umschüttelt und nach 1 Stunde, nachdem man bis auf 6 ccm aufgefüllt hat, gut mischt und zentrifugiert. Die überstehende klare Flüssigkeit wird sodann für die kolorimetrische Magnesiumbestimmung abgelesen.



Tabelle 13.

Menge Speichel pro Stunde pro Tag ccm	Wann zuletzt gegessen	Zeit der Entnahme	K mg%	Ca mg%	Mg mg%	Na mg%	Cl mg%	CNS mg%	PO <sub>4</sub> mg%
40 960	8 <sup>0</sup> Fröhst.	9,00 <sup>0</sup> —9,30 <sup>0</sup>	64,675	8,48	1,67	—	66,52	15,0	4,21
39 936	8 <sup>0</sup> Fröhst.	<sup>11<sup>0</sup></sup> 11,50 <sup>0</sup> —12,10 <sup>0</sup>	50,635	7,41	0,720	5 g KCl —	93,135	34,3	4,24
36 864	1,45 <sup>0</sup> Essen	2,20 <sup>0</sup> —2,50 <sup>0</sup>	68,90	7,42	0,633	—	88,7	28,8	4,3
38,4 921,6	1,45 <sup>0</sup> Essen	5,25 <sup>0</sup> —5,50 <sup>0</sup>	58,37	7,42	0,633	—	66,52	18,8	3,7
70 1680	7 <sup>0</sup> Fröhst.	10,00 <sup>0</sup> —10,15 <sup>0</sup>	73,06	7,83	1,05	95,32	124,18	20,5	2,7
62,3 1595	7 <sup>0</sup> Fröhst.	<sup>11<sup>0</sup></sup> 11,55 <sup>0</sup> —12,08 <sup>0</sup>	73,06	7,83	1,00	5 g NaHPO <sub>4</sub> 110,25	102,0	24,2	2,9
40,5 972	<sup>1</sup> / <sub>2</sub> 1 <sup>0</sup> Essen	2,50 <sup>0</sup> —3,10 <sup>0</sup>	73,06	7,83	1,00	117,63	97,57	22,5	3,02

Bei Anwesenheit von ausgefallenen organischen Bestandteilen im Bodensatz muß verascht, d. h. wenige Tropfen rauchende Salpetersäure hinzugefügt und wieder erhitzt werden. Wenn nun nach einem Zusatz von 1—2 ccm Ammoniumoxalat noch kein Niederschlag entsteht, evtl. wegen eines Salpetersäureüberschusses, muß evtl. wieder Ammoniak unter kräftigem Schütteln hinzugefügt werden und danach etwas Essigsäure (ca. 1 ccm), bis die Lösung nicht mehr nach Ammoniak riecht. Nach 1 Stunde wird dann zentrifugiert und der Bodensatz mit 2 Male mit 2proz. Ammoniak ausgewaschen. Nach Zugabe von 2 ccm n-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> wird erhitzt, die Lösung mit einer 0,01 n-KMnO<sub>4</sub>-Lösung titriert.

Berechnung: Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter KMnO<sub>4</sub> wird mit 0,2 multipliziert und ergibt die Menge Milligramm Ca, die in 2 ccm Speichel enthalten sind, so nach weiterer Multiplikation mit 50 der Wert Milligramm Ca in 100 ccm Speichel angegeben.

Beispiel:

Titer der 0,01 n-KMnO<sub>4</sub>-Lösung = 1,14

Titration-Kubikzentimeter . . = 0,8

$1,14 \cdot 0,8 = 0,912$ ;  $0,912 \cdot 0,2 = 0,1824$ ;  $0,1824 \cdot 50 = 9,12 \text{ mg\%Ca}$ .

Tabelle

Nr.	Zeit der Entnahme	Wann zuletzt gegessen	Menge Speichel pro Std. pro Tag ccm	K mg%	Ca mg%	Mg mg%	Na mg%	Cl mg%	CNS mg%	PO <sub>4</sub> mg%
1.	7,15 <sup>0</sup> —7,50 <sup>0</sup>	nüchtern, Zähne nicht geputzt	30,8 740	45,495 1,163	8,01 0,1999	0,570 0,0234	67,206 2,922	85,10 2,4	15,23 0,2623	9,0 0,19
2.	10,25 <sup>0</sup> —10,55 <sup>0</sup>	<sup>1</sup> / <sub>2</sub> 9 <sup>0</sup> Fröhst.	35 840	49,07 1,255	7,56 0,1887	0,597 0,0245	57,425 2,494	78,01 2,2	19,03 0,3277	10,1 0,11
3.	12,20 <sup>0</sup> —12,50 <sup>0</sup>	<sup>1</sup> / <sub>2</sub> 9 <sup>0</sup> Fröhst.	36 864	50,17 1,283	7,12 0,1777	1,023 0,421	51,635 2,244	78,01 2,2	20,83 0,3587	9,3 0,17
4.	2,55 <sup>0</sup> —3,30 <sup>0</sup>	1 <sup>0</sup> Mittagessen	29 698	51,34 1,313	7,12 0,1777	1,781 0,0732	51,290 2,230	74,92 2,1	21,5 0,3703	9,9 0,18
5.	5,15 <sup>0</sup> —5,45 <sup>0</sup>	1 <sup>0</sup> Mittagessen	36 864	51,02 1,304	7,12 0,1777	0,660 0,0271	55,575 2,424	76,12 2,1	19,6 0,3375	7,7 0,17
6.	8,30 <sup>0</sup> —9,00 <sup>0</sup>	6,15 <sup>0</sup> Vesper	36 864	50,17 1,283	7,12 0,1777	0,660 0,0271	51,29 2,230	78,01 2,2	17,5 0,3014	8,4 0,10
7.	10,30 <sup>0</sup> —11,00 <sup>0</sup>	9 <sup>0</sup> Abendessen	36 864	48,25 1,234	8,01 0,1999	0,980 0,0373	55,752 2,424	85,10 2,4	15,8 0,2721	8,0 0,13

auf diese Weise wurde für die Gesamtmenge des Ca im menschlichen Ruhezustand ein Durchschnittswert von  $12,13 \text{ mg}\%$  gefunden. Während der Gehalt Ca bis zum mittleren Lebensalter ziemlich gleich bleibt (s. 9), nimmt er mit zunehmendem Alter stark zu. Die unter physiologischen Verhältnissen gewonnenen Werte halten sich zwischen  $7,56$  und  $17,50 \text{ mg}\%$ , wobei zu beachten ist, daß der Ca-Gehalt morgens (nüchtern) am größten ist, gegen Mittag abnimmt, gegen Abend wieder langsam anzusteigen, und in der Nacht die alte Höhe wieder zu erreichen (Tab. 14). Im allgemeinen konnte festgestellt werden, daß die Ca-Konzentration sich umgekehrt proportional zur prozentualen Menge Speichel verhält, Beobachtungen, die mit denen von Janssen übereinstimmen. Bei Berechnung des Stundengehalts ergab sich allerdings, daß die Werte mit denen Janssens übereinstimmen, daß aber, wie bereits betont, bei Umrechnung der Analysenergebnisse auf diese Einheitsbasis, sei es durch Erhöhung oder Reduktion, die Übersicht nicht nur erschwert wird, sondern vor allem die Gefahr besteht, daß die erhaltenen Werte meistens in keiner Weise mehr den tatsächlichen Verhältnissen entsprechen. So finden sich z. B. Stundenwerte für Ca von  $8,33$  bis  $40,18 \text{ mg}\%$ , Werte, die durch minimale Fehler in der Bestimmung der Entnahmezeit eine erhebliche Verschiebung erfahren haben können. Allein die Möglichkeit, daß das betr. Individuum in einem unbeobachteten Augenblick bei der Entnahme den Speichel nicht abtropfen läßt, sondern heruntertrinkt (Kinder!), läßt erkennen, daß sich der „Stundengehalt“ für die Auswertung nicht eignet!

Über den Stoffwechsel des Kalziums liegen eine Reihe interessanter Arbeiten vor, die sich in der Hauptsache mit dem Verhalten des Blutkalkes nach oraler Gabe von Ca-Salzen beschäftigen. Der Speichel hat in dieser Richtung bisher wenig Bearbeitung gefunden. Wie bereits angegeben, ist es möglich, den Blutkalkspiegel und ebenfalls die Ca-Ausscheidung durch die Drüsen für einige Zeit zu erhöhen (Janssen, Knoche), des weiteren wurde von Knoche bei

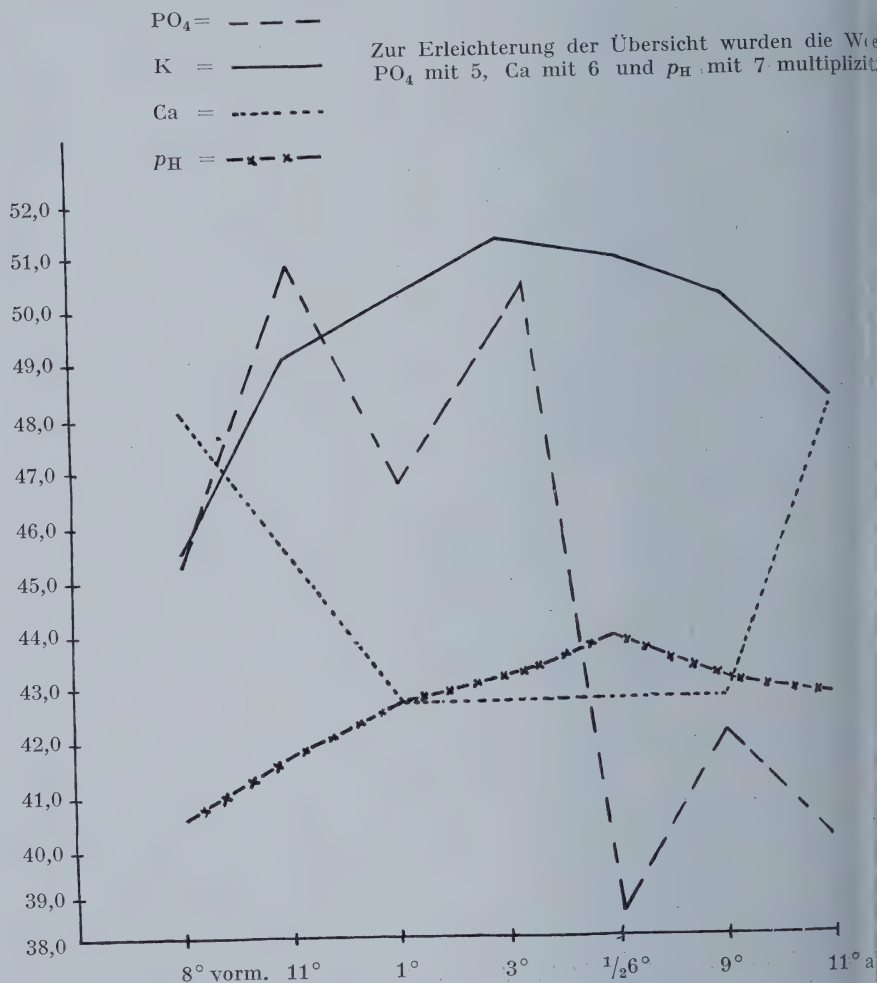
schwankungen.

$p_H$	Kat. Summe mg%	An. Summe mg%	Auf 100 äquival. Cl kommen					Verhältnis der Äquivalentgewichte					
			K	Ca	Mg	Na	$PO_4$	Na/K	Na/Cl	K/Ca	$PO_4$ /Ca	Ca/Mg	K/ $PO_4$
6,751	4,307	3,707	53,45	9,412	0,6698	78,98	10,65	1,477	0,789	5,679	1,131	14,05	5,021
			48,46	8,329	0,975	124,6	5,792	2,512	1,215	5,818	0,695	8,542	6,646
6,981	3,971	3,520	62,90	9,470	0,765	73,48	13,05	1,170	0,735	6,491	1,349	12,66	4,817
			57,05	8,577	1,114	113,4	7,800	1,987	1,134	6,650	0,909	7,702	7,313
7,119	3,702	3,590	64,33	9,127	1,342	66,18	12,14	1,029	0,662	7,046	1,318	6,959	5,343
			58,32	8,077	1,949	111,1	7,632	1,709	1,111	7,249	0,945	4,220	7,641
7,182	3,846	3,398	72,39	10,04	2,511	72,56	14,07	0,999	0,725	7,210	1,402	3,998	5,144
			65,65	8,885	3,660	111,5	8,925	1,700	1,115	7,389	1,004	2,428	7,356
7,326	3,933	3,534	59,95	8,367	0,775	65,53	9,14	1,093	0,655	7,166	1,091	10,79	6,566
			54,33	7,404	1,139	101,0	7,716	1,872	1,010	7,338	0,828	6,557	8,865
7,191	3,718	3,384	79,04	9,137	0,846	66,18	10,89	1,046	0,662	7,046	1,183	10,79	5,953
			64,15	8,077	1,242	101,3	6,841	1,738	1,013	7,220	0,847	6,557	8,525
7,132	3,894	3,506	56,70	9,632	1,067	65,51	9,424	1,155	0,655	6,024	1,001	8,821	6,002
			51,42	8,329	1,554	101,0	5,975	1,964	1,010	6,173	0,717	5,237	8,605

Fütterung mit Kalksalzen ein Sinken des Na-Gehaltes des Speichels festgestellt. Ein Befund, über den Marianne Richter-Quittner ebenfalls im Blute berichtet. Aus der Tabelle 13 sind die Ergebnisse zweier Fütterungsversuche mit KCl und  $\text{NaHPO}_4$  ersichtlich.

In dem ersten Versuch zeigt sich, daß nach 5 g KCl der Gehalt des Speichels an K zunächst fällt, um dann nach 4 Stunden leicht anzusteigen, während

Nr. 15. Tagesschwankungen.



Ca- und Mg-Spiegel fallen, und auf der anderen Seite Cl und CNS sowie Wasserstoffionenkonzentration eine deutliche vorübergehende Zunahme erfahren.

Nach einer einmaligen Gabe von 5 g  $\text{NaHPO}_4$  erfolgt eine Steigerung des K und  $\text{PO}_4$  auf der einen und parallel damit eine Senkung des Cl-Gehaltes auf der anderen Seite.

Um das Verhältnis der Ionen zueinander am besten beobachten zu können, sei hier eine Tabelle der „Tagesschwankungen“ angeschlossen (Tab. 14).

die Molekularäquivalente eingetragen sind. Kurve 15 gibt eine graphische Darstellung dieser Verhältnisse für  $\text{PO}_4$ , K, Ca und  $p_{\text{H}}$ .

Die angegebenen Werte wurden in mehreren Versuchsreihen gewonnen und sind Mittelwerte dar.

Es ist natürlich im Rahmen dieser Arbeit nicht möglich, auf die gesamte Calciumphysiologie einzugehen, die durch experimentelle Arbeiten noch wertvolle Ergebnisse zeitigen wird.

An anderer Stelle wird über die von uns eingeleiteten Untersuchungen in dieser Richtung, die bis zum heutigen Tage noch nicht abgeschlossen sind, berichtet werden.

Die Beziehungen des Ca zum P wurden bereits an anderer Stelle hervorgehoben. Wenn aus einer Lösung, die  $\text{CaCO}_3$  und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  als Bodenkörper enthält, rechnerisch festzustellen ist (Klinke), daß die Kalziumkonzentration wohl durch  $\text{PO}_4$  wie durch  $\text{CO}_3$  festgelegt ist und andererseits diese beiden Ionen in einem konstanten Verhältnis zueinander stehen müssen, so ist durch Bestimmung dieses Verhältnisses zu ermitteln, ob in einer Lösung Gleichgewicht eingetreten ist. Die Vorgänge des Gesamtkalziumstoffwechsels sind ebenfalls nach unseren heutigen Anschauungen vielfach auf das engste mit dem Phosphorstoffwechsel verknüpft. So finden wir z. B. im Serum bei mangelhaftem Phosphatangebot, daß die Ca-Werte im allgemeinen normal bleiben, während die organischen Phosphorwerte abnehmen. Ein besonderer Wert wird gerade in Rachitisforschung dieser Feststellung beigemessen, weil die Rachitis im allgemeinen unter dem Bilde einer phosphorarmen Form verläuft, worauf im Abschnitt über „Paradentosen“ noch näher zurückgekommen werden soll.

## 2. Kalium.

Alpern versuchte auf Grund sehr umfangreicher tierexperimenteller Untersuchungen festzustellen, welche Rolle im Charakter der Speichelabsonderung die antagonistisch wirkenden Kationen Kalzium und Kalium spielen und ob beiden Kationen wirklich eine Beziehung haben zur Ausarbeitung eines spezifisch sympathischen oder chordalen Sekretes. Seine Untersuchungen zeigten, daß der Speichel eine Konstanz an Kalium- und Kalziumsalzen, auch in deren Verhältnis zueinander, aufweist und ferner der Koeffizient der Beziehung  $\text{Ca} : \text{K}$  Charakter des sekretorischen Prozesses der Drüse bestimmt. Alpern wies ferner, daß Pilokarpin, namentlich aber das Physostigmin und Brotpulver eine Speichelabsonderung von miteinander sehr nahestehenden Koeffizienten der Einzelbeziehungen dieser Elektrolyte bewirkte. Der Suprareninspeichel dagegen unterschied sich wesentlich davon durch das Ansteigen des Gehaltes an Kalzium und Verminderung des Kaliums. Das Kalzium ist danach zweifellos an die Wirkung der sympathischen Nerven der Speicheldrüse gebunden, während eine Beziehung des Kaliums zum Parasympathicus nur auf Grund des Antagonismus zum Suprarenin anzunehmen ist. Beide Glieder des Koeffizienten  $\text{Ca} : \text{K}$  sind vom Parasympathischen Nerven der Drüse abhängig.

Bei Betrachtung der K- und Ca-Ergebnisse, die zu sieben verschiedenen Zeiten am selben Tage gewonnen wurden und aus der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen werden, finden sich die Angaben Alperns bestätigt.



Die K-Ca-Werte gehen alle invers, ein Befund, den wir bei fast allen durchgeführten Analysen feststellen können und der zweifellos mit den Beobachtungen Alperns in Einklang zu bringen ist.

Die Bestimmung des K erfolgte nach der von Kramer und Tisdal angegebenen Methode:

Der unverdünnte Speichel wird zwecks Entfernung evtl. vorhandener, bei der Ausführung der Bestimmung störender Beimengungen zentrifugiert und aus einem bestimmten Teil des klaren Speichelzentrifugats das vorhandene Kalium mit Natriumhexanitritkobaltat als Kobaltihexanitrid gefällt; der entstandene gut ausgewaschene Niederschlag wird bei einer

Tabelle 16. Schwankungen des Kalium- und Kalziumgehaltes des Speichels im Laufe eines Tages.

Zeit der Entnahme	Wann zuletzt gegessen	Anzahl der ccm Speichel pro Stunde pro Tag	K mg%	Ca mg%
7,15 <sup>0</sup> —7,50 <sup>0</sup>	nüchtern Zähne nicht geputzt	30,8	45,495	8,01
		740	77,95	13,73 <sup>1)</sup>
10,25 <sup>0</sup> —10,55 <sup>0</sup>	1/2 <sup>9</sup> Frühlst.	35,0	49,07	7,56
		840	98,14	15,72
12,20 <sup>0</sup> —12,50 <sup>0</sup>	1/2 <sup>9</sup> Frühlst.	36,0	50,17	7,12
		864	100,34	14,24
2,55 <sup>0</sup> —3,30 <sup>0</sup>	1 Mittagessen	29,0	51,34	7,12
		698	88,00	12,21
5,15 <sup>0</sup> —5,45 <sup>0</sup>	1 Mittagessen	36,0	51,02	7,12
		864	102,04	14,24
8,30 <sup>0</sup> —9,00 <sup>0</sup>	6,15 Vesper	36,0	50,17	7,12
		864	100,34	14,24
10,30 <sup>0</sup> —11,00 <sup>0</sup>	9 Abendessen	36,0	48,25	8,01
		864	96,50	16,02

bestimmten  $p_H$ -Konzentration mit Kaliumpermanganatlösung zersetzt, das nicht verbrauchte Kaliumpermanganat mit Oxalsäurelösung titrimetrisch ermittelt und die überschüssige Oxalsäure wiederum mit Kaliumpermanganatlösung zurücktitriert.

Die Versuchsanordnung erfolgt in folgender Weise:

Zu 1 ccm zentrifugierten Speichels setzt man tropfenweise 2 ccm Kobaltnitritreagenz und mischt beides tüchtig. Nach 45 Minuten werden 2 ccm Aqua dest. hinzugefügt, geschüttelt und etwa 1/2 Stunde lang zentrifugiert. Danach wird die über dem Bodensatz stehende klare rotbräunliche Flüssigkeit abgegossen, mit Aqua dest. wieder aufgefüllt und der Bodensatz vorsichtig mit einem Glasstab aufgerührt und wieder zentrifugiert. Dieses Auswaschen wird 3—5mal wiederholt, bis die Flüssigkeit über dem Bodensatz wasserklar ist und keine bräunliche Verfärbung mehr zeigt.

Je nach der vorhandenen Menge des Niederschlags werden jetzt 2—4 ccm 0,02 n-Kb-Lösung und ca. 1—2 ccm normale Schwefelsäure hinzugefügt, gründlich mit einem Glasstab gemischt und solange über der Flamme oder im Wasserbad bei 70—80° erwärmt, bis die Flüssigkeit sich nicht mehr ändert. Durch Zugabe von 0,01 n-Natrium-Oxalat-Lösung muß völlige Entfärbung eintreten.

Der Überschuß an Oxalat wird mit 0,02 n-KMnO<sub>4</sub>-Lösung bis zur bleibenden (einen Tropfen) Rosafärbung zurücktitriert. Die Anzahl verbrauchter Kubikzentimeter 0,01 n-KMnO<sub>4</sub>-Lösung (minus Anzahl Kubikzentimeter zugeführten Oxalats) multipliziert mit 6,5 ergibt den Kaliumgehalt an K in Milligramm in 100 ccm Speichel. Voraussetzung für eine richtige Berechnung ist, daß die 0,02 n-KMnO<sub>4</sub>-Lösung genau auf die 0,01 n-Natriumoxalatlösung eingestellt ist. Bei der Kaliumpermanganatlösung aber nur eine beschränkte Zeit hält, muß der Titer von Zeit zu Zeit festgestellt werden, der bei der Berechnung mit zu berücksichtigen ist.

Beispiel: Um 5 ccm der 0,01 n-Natriumoxalatlösung quantitativ in 2 CO<sub>2</sub> und H<sub>2</sub>O zu überführen, braucht man theoretisch ebenfalls 5 ccm der 0,01 n-KMnO<sub>4</sub>-Lösung oder die äquivalente Menge einer anderen Oxidationsmittel-Lösung.

<sup>1)</sup> Die Kursivzahlen geben die Menge pro Stunde an.

eine 0,02 n-KMnO<sub>4</sub>-Lösung verwendet wird, also 2,5 ccm. Der Titer ist dann gleich 1,0. Wenn aber z. B. statt 2,5 ccm 2,55 ccm der 0,02 n-KMnO<sub>4</sub>-Lösung gebraucht, so ist die Lösung schwächer, und zwar genau um 2%. Also ist der Titer  $\frac{2,5}{2,55} = 0,981$ , dabei ist die Natriumoxalatlösung auf 0,02 n umgerechnet. Zum Beispiel wird dem ausgewaschenen Bodensatz 1 ccm 0,02 n-KMnO<sub>4</sub>, danach 1 ccm 0,01 n-Natriumoxalat zugesetzt und der Überschuß mit 1 ccm 0,02 n-KMnO<sub>4</sub> zurücktitriert.

11,0 ccm 0,01 n-KMnO<sub>4</sub>, multipliziert mit dem Titer (0,981) = 10,79 ccm 0,01 n-KMnO<sub>4</sub>, minus 1 ccm der 0,01 n-Natriumoxalatlösung = 9,79 ccm KMnO<sub>4</sub>, 9,79 ccm 0,02 n-KMnO<sub>4</sub> = 0,6 ccm 0,01 n-KMnO<sub>4</sub> mal Titer = 0,59. 9,79 plus 0,59 = 10,38 ccm 0,01 n-KMnO<sub>4</sub>. Dies multipliziert mit 6,5 = 67,5 mg% Kalium.

Nach dieser Methode wurde der Gehalt der Mundflüssigkeit an K von mehreren Personen sowohl zu verschiedenen Zeiten desselben Tages (Tab. 17) wie an mehreren Tagen mit größeren und kleineren Zeitabständen gemessen.

Wie in Tab. 17 angeführten Versuchspersonen sind klinisch gesund. Es zeigt sich zunächst, daß die Schwankungen des K im Laufe eines Tages im Gegensatz zu den meisten anderen Ionen nicht sehr groß sind, und daß die Nüchternwerte gegenüber den anderen Tageswerten fast durchwegs herabgesetzt sind. Diese

Tabelle 17. K-Gehalt des Speichels an verschiedenen Tagen.

Zeit der Entnahme	Wann zuletzt gegessen	Menge Speichel pro Stunde pro Tag	K mg%					
			1. Tag	2. Tag	3. Tag	4. Tag	1. Tag	2. Tag
15 <sup>0</sup> —7,50 <sup>0</sup>	nüchtern	30,8 ccm 740 "	45,24	54,22	58,37	63,83	32,50	52,84
25 <sup>0</sup> —10,55 <sup>0</sup>	8,30 <sup>0</sup> Frühstück	35,0 " 840 "	55,25	57,0	61,88	—	35,10	56,42
20 <sup>0</sup> —12,50 <sup>0</sup>	8,30 <sup>0</sup> Frühstück	36,0 " 864 "	52,00	60,58	63,31	72,15	37,70	57,52
55 <sup>0</sup> —3,30 <sup>0</sup>	1 <sup>0</sup> Mittagessen	29,0 " 696 "	57,03	66,36	—	—	40,30	58,69
15 <sup>0</sup> —5,45 <sup>0</sup>	1 <sup>0</sup> Mittagessen	36,0 " 864 "	49,40	62,76	64,02	65,9	41,60	58,37
30 <sup>0</sup> —9,00 <sup>0</sup>	6 <sup>0</sup> Tee	36,0 " 864 "	57,85	54,1	62,59	—	39,00	57,52
30 <sup>0</sup> —11,00 <sup>0</sup>	8,30 <sup>0</sup> Abendessen	36,0 " 864 "	54,66	—	—	—	41,60	—

A

B

Bei der Beobachtung konnte auch bei der Bestimmung anderer Ionen gemacht werden und muß dahin gedeutet werden, daß hier Zusammenhänge mit der Diffusionsgeschwindigkeit und evtl. mit Rückresorptionsvorgängen bestehen.

Wie auch bei den ersten Kaliumanalysen, die vom Speichel derselben Person in verschiedenen Zeitabständen gemacht wurden, zeigte sich schon, daß eine gewisse Konstanz des K-Gehalts nur im Laufe desselben Tages vorhanden ist (Tab. 16), während mit der Zeit größere Schwankungen auftreten. Außerdem schienen auch individuelle Unterschiede zu bestehen, wie auf den ersten Blick schon aus der Tab. 17 hervorgeht, so daß aus diesem Grunde zur Erlangung physiologischer Durchschnittswerte ein größeres Analysenmaterial herangezogen werden mußte. Aus der Tab. 9 ist ersichtlich, daß für das relativ kariesimmune Gebiß der Mittelwert des Kaliums für den gemischten Ruhespeichel bei 55,89 mg% liegt. Gegenüber den anderen Elektrolyten verhält sich das Kalium im Laufe der verschiedenen Altersstufen abweichend und zwar hält sich der Gehalt etwa

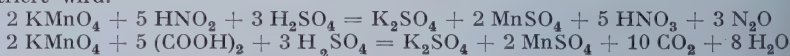
bis zum 40. Lebensjahr auf gleicher Höhe, um dann erst weiter anzusteigen. Diese zunehmende Ausscheidung der Elektrolyte, wie wir sie fast überall im dem 40. Lebensjahr beobachten können, mag darauf zurückgeführt werden, daß der Körper im höheren Alter die mit der Nahrung aufgenommenen Kalkstoffe, die er zum Aufbau des Knochengerüsts nicht mehr benötigt, wieder abgibt. Fast allgemein wird dieser Vorgang heute für das Zustandekommen der Arteriosklerose angenommen, wenn auch noch andere Voraussetzungen hierzu gegeben sein müssen. Bei der Zahnsteinbildung soll hierauf noch zurückgekommen werden. Gegenüber dem Blut (20,0 mg %) finden wir im Speichel einen auffallend hohen Gehalt an Kalium, der nur noch durch das Natrium, das auch in den anderen Körperflüssigkeiten dominiert, übertroffen wird.

### 3. Natrium.

Das Natrium zeigt von allen Kationen die größten Schwankungen, die keineswegs mit dem Chlor parallel gehen. Es zeigt sich überhaupt bei Durchsicht des Analysenmaterials, daß es nicht statthaft ist, wie das bisher meistens geschehen ist, aus den gefundenen Chlorwerten den Kochsalz- oder Na-Gehalt ohne weiteres zu berechnen, worauf Tschopp ganz besonders aufmerksam gemacht hat. Bei der Vermehrung des Salzgehaltes durch erhöhte Sekretion ist das Natrium besonders beteiligt, aber außer dieser vorübergehenden Zunahme der Sekretion durch die eine absolut vermehrte NaCl-Ausscheidung vorgetäuscht werden kann, fand Sticker, daß beim Menschen NaCl-Zufuhr per os den NaCl-Gehalt des Speichels in weiten Grenzen zu steigern vermag. Für die erheblichen Schwankungen des Na sind also wohl in der Hauptsache psychische und mechanische Reize, sowie tierische Nahrungsmittel und NaCl-Zufuhr zur Erklärung anzusprechen.

Die Bestimmung des Na erfolgte nach einer neueren, von Tschopp herausgegebenen, Methode in folgender Weise:

Nachdem das Na als schwerlösliches Komplex NaCsBi-Nitrit, dessen Formel von Tschopp mit  $\text{Na}_2\text{Cs}_9(\text{Bi}[\text{NO}_2]_6)_5$  angegeben wird, gefällt ist, wird mit Kaliumpermanganat die durch Oxydation der Nitritreste zu Nitraten erfaßt. Am besten, indem das im Überschuß zugesetzte  $\text{KMnO}_4$  mit Oxalat entfärbt und das überschüssige Oxalat wieder mit Permanganat zurücktitriert wird.



Die Ausführung der Bestimmung erfolgt derart, daß man 0,5 ccm Speichel in einem Zentrifugenglas mit 0,5 ccm 20proz. Trichloressigsäure und 1,5 ccm Aqua dest. gut umschüttelt und nach  $\frac{1}{2}$  Stunde zentrifugiert. 1 ccm des klaren Zentrifugates wird mit 1–2 Tropfen verdünnter Salpetersäure solange vorsichtig erwärmt, bis braune Dämpfe entstehen. Nach dem Erkalten gibt man 2 ccm des Ballschen Reagens hinzu und läßt 20 Stunden im Eisschrank stehen. Nach dieser Zeit wird die Innenwandung mit Glasstab abgerieben und 5 Minuten zentrifugiert. Nun wird die überstehende Lösung vorsichtig mit einer Pipette abgesogen und der Niederschlag aufzurühren läßt man 3 ccm eiskalte Azetonmanitlösung zufließen, damit man die Wandung gleichzeitig damit abspült, und zentrifugiert. Das wird 3mal wiederholt. Der Bodensatz nicht mehr gelblich verfärbt ist. Jetzt fügt man, wie bei der K-Bestimmung, einen Überschuß von 0,02 n- $\text{KMnO}_4$  (ca. 4–6 ccm) mit 1–2 ccm 20proz. Schwefelsäure zu, mischt gründlich und erwärmt im Wasserbade einige Minuten, bis die Lösung vollkommen rosa ist. Sodann gibt man genügend 0,01 n-Natriumoxalatlösung hinzu, bis völlige Entfärbung eingetreten ist. Der Überschuß von Oxalat wird dann in der Wärme durch Titration mit 0,02 n- $\text{KMnO}_4$  bis zur Rosafarbe titriert.

Die Anzahl der verbrauchten Kubikzentimeter  $\text{KMnO}_4$  multipliziert mit 0,023 ergibt die Anzahl Milligramm Na in der Zahl der zur Analyse gebrauchten Kubikzentimeter Speichel.



Beispiel: In dem 1 cm des verwendeten klaren Zentrifugates befinden sich nur 0,2 cm Speichel. Titriere ich also z. B. 4,35 cm, so sind in 0,2 cm Speichel  $4,35 \cdot 0,023 = 0,2 \text{ mg Na}$  enthalten, also in 100 cm Speichel = 100 mg Na.

Für das Na wurde ein Mittelwert von  $69,88 \text{ mg}\%$  im gemischten Speichel gefunden, und auch hier konnte wieder festgestellt werden, daß bei vorgeschrittenem Alter die Natriumausscheidung zunimmt (Tab. 9), die aber bei weitem nicht die Höhe erreicht, wie wir sie im Blute zu finden gewohnt sind ( $325,0 \text{ mg}\%$ ).

#### 4. Magnesium.

Als letztes Kation bliebe noch das Magnesium zu besprechen, das zahlenmäßig weit hinter den anderen Kationen zurücksteht. Seine quantitative Bestimmung wurde nach zwei verschiedenen Methoden ausgeführt, von denen die eine nach Kramer und Tisdall, modifiziert nach St. Gadiant, auf folgendem Prinzip beruht:

Nach der Fällung des Kalziums erhaltene klare Zentrifugat (s. Kalziumbestimmung) mit Ammoniumphosphatlösung versetzt, wodurch vorhandenes Mg als Ammoniummagnesiumphosphat gefällt wird. Nach wiederholtem gründlichem Auswaschen des entstandenen Niederschlages wird derselbe durch Zugabe von Schwefelsäure zersetzt und die freigewordene Phosphat in gleicher Weise, wie bei der Bestimmung des säurelöslichen Phosphors (s. ebenda), kolorimetrisch bestimmt. Aus der gefundenen Phosphatmenge läßt sich das vorhandene Mg sodann berechnen.

Die Versuchsanordnung erfolgt in der Weise, daß zu den 5 cm der klaren Flüssigkeit, über Zentrifugat für die Ca-Bestimmung, in einem kleinen Zentrifugenglas 1 cm Ammoniumphosphatlösung + 2 cm konz. Ammoniak hinzugefügt werden und dieses zusammen über Nacht stehen läßt. Sodann wird am nächsten Tage nach Gadiant der Bodensatz, bestehend aus Mg-Ammoniumphosphat, 2—3 mal mit 2proz. Ammoniak ausgewaschen, 2—3 cm Schwefelzugesetzt, nach kräftigem Umrühren erwärmt und in einen Meßzylinder sorgfältig umgefüllt (Nachspülen mit Aqua dest.). Zu dem Umgefüllten werden 1 cm Molybdänsäurelösung + 12 cm Hydrochinonlösung zugesetzt. Gleichzeitig in einem zweiten Meßzylinder 1 cm Molybdänsäure + 2 cm Hydrochinon + 10 cm Vergleichsphosphorsäurelösung (enthaltend 10 mg Phosphor) + 1 cm 2proz. Natriumsulfatlösung. Die in den meisten Fällen dunklere Vergleichslösung wird sodann so weit verdünnt, bis die Farbe beider Lösungen ungefähr gleich ist. Nach 30 Minuten kann die kolorimetrische Bestimmung vorgenommen werden. Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\text{Lsg.-Standard-Lösung} \cdot \text{Stärke-Standard-Lösung} \cdot \text{Verdünnung Versuchs-Lösung}}{\text{Ablesung-Versuchs-Lösung} \cdot \text{Verdünnung Standard-Lösung}} \cdot 0,784 \cdot 50$$

Es ergibt sich der Mg-Gehalt in 100 cm Speichel.

Die zweite Bestimmung des Mg nach Tschopp, die von uns in der Hauptsache ausgeführt wurde, zeigte eine wesentlich bessere und dauerhaftere und für den kolorimetrischen Vergleich günstigere Blaufärbung.

Prinzip der Methode: Das Mg wird aus der kalziumionfreien Lösung als Magnesiumammoniumphosphat gefällt; der in wenig Salzsäure aufgelöste Niederschlag gibt mit Molybdänsäure und einer Eikonogenlösung (eine Aminonaphtholsulfosäure) eine Blaufärbung, welche im Kolorimeter mit derjenigen einer gleichbehandelten Standardlösung verglichen wird.

Ausführung der Bestimmung: 5 cm des bei der Ca-Bestimmung erhaltenen Zentrifugates werden in einem Zentrifugenglas mit 1 cm Ammoniumphosphat und 2 cm 20proz. Ammoniak versetzt, auf etwa  $80^\circ$  erwärmt und 12 oder mehr Stunden gut verschlossen stehen gelassen. Der gebildete Niederschlag von Mg-Ammoniumphosphat wird nach den Vorschriften von Tschopp abzentrifugiert, 3 mal mit 2proz. Ammoniak ausgewaschen, in 10 Tropfen 2 n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  gelöst und quantitativ mit Aqua dest. in ein Mikro-Kjeldahl-Glas mit einer Marke bei 25 cm überführt. Nun gibt man 1 cm Molybdänsäure und 2 cm Eikonogenlösung hinzu. Gleichzeitig werden in ein anderes Mikro-Kjeldahl-Glas 10 cm der 0,1 mg Phosphor enthaltenden Standardlösung, 1 cm Molybdänsäure, 10 Tropfen 2 n- $\text{H}_2\text{SO}_4$  und 2 cm Eikonogenlösung zugesetzt. Standard- und Versuchslösung kommen gleichzeitig für 6 Minuten in ein auf  $35^\circ$  erwärmtes Reagenzglas, darauf ohne zu schütteln für 3 Minuten in kaltes Wasser. Die entstandene haltbare Blaufärbung wird, nachdem beide Lösungen mit phosphatfreiem Wasser auf 25 cm aufgefüllt sind, im Kolorimeter verglichen.



Berechnung: Da die angewandte Flüssigkeitsmenge 1,66 ccm beträgt, so ergibt sich der Mg-Gehalt in 100 ccm nach folgender Formel:

$$C = C_1 \cdot \frac{S_1 \cdot 78,55}{S \cdot 1,66},$$

wobei  $C_1$  gleich 0,1 und  $S_1$  bzw.  $S$  die Schichtdicken der Test- bzw. Versuchslösung bedecken oder bei Kolorimeteereinstellung auf 20 mm:  $\frac{94}{S} = \text{mg Mg in 100 ccm.}$

Mit Hilfe dieser Bestimmungsmethode wurde für das Magnesium im Speichel ein Durchschnittswert von 1,29 mg% gefunden, der gegenüber dem Natrium (2,0 mg%) sehr niedrig ist. Nüchtern zeigten sich im allgemeinen die niedrigeren Werte, in den Mittagsstunden erreichen sie ihren Höhepunkt, um dann langsam wieder abzufallen. Es scheint so, als ob das Magnesium, über dessen Eigenschaften und Aufgaben nur wenig bekannt ist, invers mit dem Natrium verhält. Größere Unterschiede in den verschiedenen Altersstufen konnten nicht festgestellt werden.

## e) Anionen.

### 1. Chlor.

Ganz unabhängig vom Natrium wurde der Speichel auf seinen Gehalt an Chlor analysiert, und zwar wurde ursprünglich nach dem von Bang angegebenen Verfahren vorgegangen. Seine Methode, die im folgenden mit angeführt werden soll, erwies sich aber auf die Dauer nicht immer als ausreichend, da sie nur mit sehr geringer Genauigkeit arbeitet.

Sie ist eine im Mikromaßstab sich abspielende Fällungsanalyse. Nur wird in alkoholischer Milieu gearbeitet, um die Bildung von  $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$  besser feststellen zu können. Sonst spielt die Reaktion wie gewöhnlich ab. Cl-Ionen werden von Ag-Ionen als Ag-Cl gefällt. Der Überschuß an Ag tut sich im Auftreten des rotbraunen  $\text{Ag}_2\text{CrO}_4$  kund.

Die Ausführung der Bestimmung erfolgt in der Weise, daß man genau 0,1 ccm Speichel von einem Stück Bangschen Filtrierpapier aufsaugen läßt, dies auf den Boden eines Reagenzglases bringt und dann so viel chlorfreien Alkohol hinzufügt, bis das Papier ganz bedeckt ist (ca. 5 ccm). Nach 3—4 Stunden wird die Flüssigkeit in einem Spitzglas mit 0,01 n-Silberlösung bis zur lichtbraunen Färbung titriert.

Als Indikator werden vorher etwa 2 Tropfen 10proz. Kaliumchromatlösung hinzugegeben, gut umgeschüttelt und etwas Aqua dest. zum Aufhellen hinzugegeben. Es ist wichtig, um gute Resultate zu erhalten, das Filtrierpapier nachzuspülen, und ferner zur Titration eine 10 ccm-Bangsche Bürette mit 0,05-ccm-Einteilung und Glashahn zu verwenden. Ferner muß vor dem verbrauchten Kubikzentimetern so viel abgezogen werden, als von der Maßflüssigkeit für den blinden Versuch, der stets angestellt werden muß, verbraucht wurde. Wie auch Bang angibt, betrug diese Menge gewöhnlich für den von uns verwendeten Alkohol 0,05 ccm.

Die Berechnung des Cl erfolgt durch Multiplikation der Menge der titrierten  $\text{AgNO}_3$ -Lösung mit 354,6 und ergibt die Anzahl Milligramm Cl in 100 ccm Speichel.

In Vergleichsanalysen konnte festgestellt werden, daß das von Tschopp entwickelte Verfahren bessere und zuverlässigere Resultate lieferte:

Sie stellt eine Restmethode dar. Die Cl-Ionen werden mit der 0,02 n- $\text{AgNO}_3$ -Lösung (mit Überschuß hinzugefügt) als AgCl gefällt, abfiltriert und das noch vorhandene  $\text{AgNO}_3$  fällung analytisch mit 0,02 n-KJ-Lösung bestimmt. Hierbei bildet sich schwer lösliches AgJ. Der Überschuß an Kaliumjodid tut sich durch Auftreten der Jodstärkereaktion kund, indem dem KJ durch anwesende  $\text{HNO}_3$  Jodwasserstoff frei wird, der sich mit dem Nitrit zu Nitrosjod und dieses mit der Stärke zu dem bekannten blauen Produkt umsetzt.

Bestimmung: In einem 25-ccm-Kolben werden abgefüllt 1 ccm Speichel, 10 ccm 0,02 n- $\text{AgNO}_3$ , 1 ccm Trichloressigsäure und 1 ccm konz. Salpetersäure. Nachdem gründlich geschüttelt ist, wird bis zur Marke aufgefüllt und die Lösung nach einer halben Stunde durch ein feines Filter filtriert. Von diesem Filtrat werden 20 ccm mit 3 ccm Stärkelösung und 0,5 ccm rauchender Salpetersäure versetzt und das überschüssige Silberion mit 0,02 n-Kaliumjodidlösung bis zur Blaufärbung titriert.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\left[ x - \left( z \cdot \frac{a}{b} \right) \right] \cdot \frac{71}{y} = \text{mg Cl in 100 ccm Speichel.}$$

$x$  = zugesetzte Menge 0,02 n-AgNO<sub>3</sub>-Lösung;  
 $z$  = im Hauptversuch verbrauchte Menge 0,02 n-Kaliumjodidlösung minus Blindwert;  
 $a$  = Gesamtverdünnung (25 ccm);  
 $b$  = die zur Chlorbestimmung angewandte Menge Filtrat (20 ccm);  
 $y$  = angewandte Flüssigkeitsmenge.

Für das Chlor wurde — in der Hauptsache nach der letzteren Methode — ein Mittelwert von 74,68 mg% gefunden, der im vorgeschrittenen Alter eine Höhe von 83,69 mg% erreicht. Im Speichel ist Chlor wohl vorwiegend an Natrium gebunden, während daneben ebenfalls Verbindungen mit K, NH<sub>4</sub> und Ca bestehen, welche die Stärkeverdauung durch den Mundspeichel nach den Untersuchungen von Clifford beschleunigen sollen. Tab. 18 zeigt deutlich die individuellen Unterschiede, die Mittelwerte einer größeren Untersuchungsreihe von drei Personen darstellen.

Tabelle 18. Schwankungen des Speichelchlorgehaltes im Laufe eines Tages.

Nr.	Zeit der Entnahme	Wann zuletzt gegessen	mg Cl in 100 ccm Speichel		
			1.	2.	3.
1.	3 <sup>0</sup> nachm.	2 <sup>0</sup> Mittagessen	84,31	88,7	93,13
2.	1/2 <sup>5</sup> nachm.	2 <sup>0</sup> Mittagessen	97,62	110,87	119,74
3.	6 <sup>0</sup> nachm.	2 <sup>0</sup> Mittagessen	97,62	79,83	115,31
4.	9 <sup>0</sup> abends	8 <sup>0</sup> Abendessen	79,83	77,70	108,61
5.	11 <sup>0</sup> abends	8 <sup>0</sup> Abendessen	70,96	75,39	91,30
6.	1/2 <sup>8</sup> morgens	nüchtern	133,05	75,39	106,83
7.	9 <sup>0</sup> morgens	nüchtern	88,70	66,52	99,44
8.	3/4 <sup>12</sup> mittags	9 <sup>0</sup> Frühstück	88,70	66,52	93,13
9.	3 <sup>0</sup> nachm.	1 <sup>0</sup> Mittagessen	97,62	66,52	75,39
10.	5 <sup>0</sup> nachm.	1 <sup>0</sup> Mittagessen	57,65	48,78	68,44
11.	7 <sup>0</sup> abends	5 <sup>0</sup> Vesper	48,78	44,35	54,31
12.	9 <sup>0</sup> abends	1/2 <sup>9</sup> Abendessen	57,65	63,18	88,70

Das Mittagessen vor Analyse 1 der vorstehenden Tabelle wurde von allen Personen mit möglichst viel Kochsalzzusatz genossen, während das Essen vor der Analyse 9 am nächsten Tag möglichst kochsalzarm zubereitet wurde. Man sieht sich der Gehalt des Speichels an Chlor bei allen drei Personen in gleicher Weise verändert. Nach dem ersten Mittagessen wurde eine Steigerung der Chlorwerte beobachtet, die bereits um 1/2<sup>5</sup> Uhr ihren Höhepunkt erreicht hatte, um 11 bis abends 11 Uhr auf ihren niedrigsten Stand abzufallen. Während nach dem kochsalzarmen Essen die Cl-Werte langsam abfallen, um gegen Abend erst wieder anzusteigen. Die Nüchternwerte morgens stellen also im Laufe desselben Tages die Maximalwerte dar.

## 2. Phosphor.

Unsere Bestimmungen des anorganischen Phosphors im Speichel erfolgte nach verschiedenen Methoden, von denen sich die nach Tschopp als ganz besonders zuverlässig erwies. Aber auch das von Bell und Doisy angegebene Verfahren lieferte hinreichende Resultate, so daß eine nähere Beschreibung der Ausführung unserer Bestimmungen an dieser Stelle erfolgen soll.

#### Bestimmung nach Bell-Doisy:

Um den säurelöslichen Phosphor des Speichels nachweisen und bestimmen zu können, das Eiweiß zunächst durch 20proz. Trichloressigsäure ausgefällt werden. Nach dem Filtrieren des ausgeschiedenen Eiweiß wird das Filtrat mit Molybdänsäurelösung versetzt und durch Zugabe von Hydrochinonlösung die entstandene Phosphormolybdänsäure reduziert, dabei entstandene Blaufärbung wird kolorimetrisch mit einer bekannten Phosphorstandardlösung verglichen.

**Bestimmung:** In einem 25-cm-Kolben werden zu 2 ccm zentrifugiertem Speichel 10 ccm Aqua dest. und 5 ccm 20proz. Trichloressigsäure hinzugefügt und bis zur Marke aufgeschüttelt. Sodann wird filtriert und von der klaren Flüssigkeit 10 ccm für die Bestimmung verwendet, die in einem Maßzylinder mit 1 ccm Molybdänsäurelösung und 2 ccm Hydrochinonlösung aufgefüllt werden. In einen zweiten Maßzylinder werden 1 ccm Molybdänsäurelösung und 2 ccm Hydrochinonlösung mit 10 ccm Vergleichsphosphorsäure (enthaltend 0,05 mg P) gegeben. Nach 5 Minuten wird beiden Maßzylindern je 10 ccm Karbonatsulfidlösung zugefügt, worauf eine intensive Blaufärbung eintritt. Es erfolgt sodann nach weiteren 5 Minuten die kolorimetrische Bestimmung in gleicher Weise wie bei der Bestimmung des Magnesiums (s. oben).

**Berechnung:** Der Phosphorgehalt in 100 ccm Flüssigkeit ergibt sich nach folgender Formel:

$$C = \frac{S_1 \cdot C_1 \cdot b}{S \cdot x \cdot b_1} \cdot 100,$$

wobei  $S_1$  bzw.  $S$  die Schichtdicken der Standard- bzw. Versuchslösung,  $C_1 = 0,1$  mg P,  $x$  = angewandte Menge der zu untersuchenden Flüssigkeit (2 ccm),  $b_1$  bzw.  $b$  = Verdünnung der Standard- bzw. Versuchslösung bedeuten.

Außer dieser von Bell und Doisy angegebenen Methode haben C. H. Fisher, Y. Subbarow, K. Lohmann und L. Jendrassik ein Verfahren zur Bestimmung der anorganischen Phosphate in Blut und Urin bzw. im Muskelextrakt unter Benützung einer Aminonaphtholsulfosäure als Reduktionsmittel ausgearbeitet. Dieses von Tschopp modifiziert wurde, uns ebenfalls sehr gute Resultate lieferte und daher in der Hauptsache Anwendung fand.

**Prinzip der Methode:** Das Filtrat wird mit Molybdänsäure und Eikonogen versetzt, die dabei entstehende Blaufärbung zur kolorimetrischen Bestimmung benutzt.

**Ausführung der Bestimmung:** 10 ccm des klaren Filtrates (bei phosphatreichen Flüssigkeiten nimmt man entsprechend weniger) werden in ein Mikro-Kjeldahl-Glas, das eine Marke bei 25 und 50 ccm trägt, pipettiert und mit 1 ccm Molybdänsäure und 2 ccm Eikonogenlösung (s. bei der Mg-Bestimmung) versetzt.

Gleichzeitig werden dieselben Mengen Molybdänsäure und Eikonogenlösung in einem anderen Mikro-Kjeldahl-Glas zu 10 ccm der Vergleichsphosphorlösung (enthaltend 0,1 mg P) — s. Magnesiumbestimmung — und 1 ccm 15proz. Trichloressigsäure hinzugesetzt. Da die Geschwindigkeit der Farbenvertiefung ebenso wie der Endzustand durch die Azidität beeinflusst werden, müssen Standard- und Versuchslösung gleich viel Säure enthalten. Jetzt kommen Standard- und Versuchslösung gleichzeitig für 6 Minuten in ein auf 35° erwärmtes Wasserbad, darauf, ohne zu schütteln, für 3 Minuten in kaltes Wasser. Nun gibt man phosphatfreies Wasser zu und so, daß die dunklere Lösung auf 50 ccm und die hellere auf 25 ccm aufgefüllt wird.

Die Berechnung erfolgt in derselben Weise, wie in dem Verfahren von Bell und Doisy angegeben wurde.

Mit Hilfe dieser beiden Bestimmungen wurde für den gemischten Ruhespeichel bei relativ kariesimmunem Gebiß (Tab. 9) ein Mittelwert von 4,5 mg% anorganischem Phosphor gefunden, dem 13,6 mg%  $PO_4$  entspricht. Die Phosphorausscheidung durch den Speichel im jugendlichen Alter, also etwa in der gewöhnlichen Periode des Knochenwachstums ist nur ganz wenig erhöht (14,06 mg%  $PO_4$ ) während der anorganische Phosphorgehalt des Blutes in dieser Zeit gegen den Durchschnittswerten von 12,2 mg% etwa 15,5 mg%  $PO_4$  und mehr betragen kann. Im mittleren Lebensalter, also nach Beendigung des Knochenwachstums, fällt sodann der  $PO_4$ -Gehalt des Speichels auf etwa 12,06 mg%  $PO_4$ , um später wieder anzusteigen (15,41 mg% zwischen 40. und 70. Lebensjahr), während im Blut der Gehalt wieder auf die Norm von etwa 12,2 mg%



zurücksinkt. Im ganzen liegen die anorganischen Phosphorwerte im Speichel höher als im Blut, was vielleicht den Ausdruck eines Sekretionsprozesses stellt, der mit den Untersuchungen von Camis in Einklang zu bringen ist. Und bei 20 Minuten lang fortgesetzter faradischer Reizung einen Anstieg des  $\text{P}$ -Gehaltes der Drüse um maximal 337%, auch das die Drüse verlassende Blut eine leichte Steigerung des Gehaltes an  $\text{PO}_4$ . Es scheint also danach auch der Drüsentätigkeit eine komplexe phosphorhaltige Substanz umgesetzt zu werden. Die ganz unabhängig von der Nahrungsaufnahme gemessenen Werte im Laufe eines Tages zeigen zum Teil erhebliche Schwankungen, wobei zu beachten ist, in der Regel, d. h. nicht immer, die Nüchternwerte morgens am höchsten liegen. Die in die Tab. 9 eingetragenen Äquivalentwerte des Phosphors wurden nicht der üblichen Weise bestimmt, sondern nach der von Reichel und Spiro angegebenen Tabelle errechnet, in der entsprechend dem Vorschlage von W. Wiewski die Phosphationen bei gegebener  $p_{\text{H}}$  derartig berechnet sind, als ob

Tabelle 19. Phosphatäquivalent.

$p_{\text{H}}$	Faktor F	$\text{PO}_4$ 100 $\text{F}_1$	$\text{P}_2\text{O}_5$ 100 $\text{F}_2$
5,29	1,025	1,078	1,443
5,59	1,05	1,105	1,477
5,91	1,10	1,157	1,549
6,24	1,20	1,263	1,690
6,47	1,30	1,368	1,830
6,64	1,40	1,473	1,971
6,81	1,50	1,579	2,112
6,98	1,60	1,684	2,252
7,17	1,70	1,788	2,393
7,38	1,80	1,894	2,534
7,73	1,90	1,999	2,675
8,04	1,95	2,051	2,746

1 Molekül  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  und 2 Moleküle  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  vorkommen, also ein komplexes wertiges Ion  $\text{H}_4(\text{PO}_4)$  vorläge. In dieser vorstehend angeführten Tabelle sind in der ersten Kolonne die gesamten Basenäquivalente angegeben, die einem Äquivalent Phosphat entsprechen, in der nächsten dasselbe für 100 g Phosphat und in der letzten dasselbe für 100 g  $\text{P}_2\text{O}_5$  (zit. nach Reichel-Spiro).

### 3. Rhodan.

Der Untersuchung des Rhodangehaltes des Speichels wurde in diesem Zusammenhang besondere Aufmerksamkeit gewidmet. Bei Durchsicht der Literatur findet man, daß dieses an und für sich am schwächsten vertretene Anion bisher die meiste Bearbeitung gefunden hat. Dies ist darauf zurückzuführen, daß von der dem Sulfozyankalium des Speichels eine besondere Wirkung zugesprochen wurde. Es ist heute bekannt, daß sich das Rhodan nicht nur im Speichel, sondern auch im Magensaft, Blut, in der Lymphe, Galle und Milz vorfindet, während es nach Munk KCNS nur im Harn findet. Aus der nachfolgenden Aufstellung geht hervor, wie außerordentlich die gefundenen Werte der einzelnen Autoren variieren, was vermutlich auf die verschiedene Untersuchungsmethodik zurückzuführen ist. Es fanden z. B. in 1000 Teilen Speichel:



Tabelle 20.

Rhodan		Rhodan	
Frerichs . . . . .	0,10	Fleckseder . . . . .	0,05
Jacobowitsch . . . . .	0,062	Michel . . . . .	0,02
Hammerbacher . . . . .	0,041	Lehmann . . . . .	0,0
Vierordt . . . . .	0,098—0,239	Reissner . . . . .	0,1
Bruylants . . . . .	0,062	Schneider: Raucher . . . . .	0,1
Munk . . . . .	0,167	Schneider: Nichtraucher . . . . .	0,1
Kruger . . . . .	0,072	Krüger: Raucher . . . . .	0,17
Mayer . . . . .	0,003	Krüger: Nichtraucher . . . . .	0,0
Lohmann . . . . .	0,14		

Man ist heute noch nicht in der Lage, eine sichere biochemische Erklärung, die Entstehung des Rhodans zu geben. Man ist geneigt die Bildung aus Nitril anzunehmen, die ihrerseits durch Abspaltung von Kohlensäure aus Amidosen und Oxydation entstehen. Läßt man z. B. nach Miller ein Nitril in Gegenwart von Alkali auf Eiweiß einwirken, so entsteht Rhodan. Nach Lohmann (zit. Schönbeck) könnte man annehmen, daß das Vorkommen des Rhodans im Organismus auf eine Schutzwirkung des Körpers zurückzuführen ist, indem in geringer Menge auftretenden Nitrile, die äußerst giftige Stoffe sind, durch Wechselwirkung mit Eiweißkörpern unschädlich gemacht werden. Dies ist so leichter erklärlich, als sich im Organismus keine Nitrile nachweisen lassen, sondern diese in statu nascendi in Rhodan übergeführt werden.

Die von Miller stark betonte bakterizide Kraft ist bisher experimentell nicht sicher erwiesen. Wie Bittorf mitteilt, brachte Cavazzani das Rhodan in Verbindung mit Fermentwirkungen und stellte bei seiner Anwesenheit eine Hemmung der Pepsinwirkung fest, woraus er weitgehendste Schlüsse zog. Da das Rhodan so gut wie konstant nur im Speichel des Menschen und derjenigen Tiere zu finden ist, die wie der Mensch einen stark diastatischen Speichel produzieren, versuchten Bittorf und von Falkenhausen die Frage zu beantworten, ob künstlicher Rhodankalizusatz zu normalem Speichel dessen diastatische Wirkung irgendwie beeinflußt. Nach ihren Untersuchungsergebnissen ist das Vorkommen von Rhodan in Speichelkalium zweifellos nichts „Zufälliges“, sondern es hat vielmehr bei Anwesenheit von Chlornatrium eine die diastatische Kraft des Ptyalins außerordentlich stark fördernde Wirkung, während die Angaben Sacchettos dem Rhodan eine entgegenstehende Wirkung zusprechen.

Für mich handelte es sich in erster Linie darum, mit einer zuverlässigen Methode unter Ausnutzung aller bisherigen Erfahrungen den Gehalt des Speichels an Rhodan festzulegen. Es wurde dabei folgendermaßen verfahren:

Die Bestimmung des Rhodans wurde kolorimetrisch durchgeführt, und zwar war es zweckmäßig, derartig vorzugehen, daß man zwei Versuche ansetzte und in beide gleiche Mengen einer bestimmten Kalium-Rhodanid-Eisenchlorid-Lösung bei bekannter Säurekonzentration einbrachte. Sodann setzt man zu dem einen der beiden Versuche eine abgemessene Menge zentrifugierten Speichels, wodurch die Farbintensität der mit Speichel versetzten Probe zunimmt. Um nun die vorhandene Rhodanmenge im Speichel zu ermitteln, verdünnt man die Probe mit Speichel versetzt wurde, so lange mit Aqua dest., bis beide Proben ungefähr die gleiche Farbintensität aufweisen und nimmt dann die Kolorimetrie vor.

Ausführung: In einem Meßzylinder werden zu 1 ccm zentrifugiertem Speichel 1 ccm Standardlösung (= K-Rhodanid), 1 ccm Ferrichlorid und 5 Tropfen konz. Salzsäure abgemessen. In einen zweiten Meßzylinder kommen 1 ccm Ferrichlorid, 1 ccm Standardlösung und 5 Tropfen konz. Salzsäure. Sodann wird so weit verdünnt, bis beide Farben ungefähr gleich sind.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel:

$$\frac{\text{Ablesung-Standardlösung} \cdot \text{Stärke-Standardlösung} \cdot \text{Verdünnung-Versuchslösung}}{\text{Ablesung-Versuchslösung} \cdot \text{Verdünnung-Standardlösung}} \cdot 100 = \text{mg Rhodanid auf 100 ccm Mundflüssigkeit.}$$

Als Gesamtmittelwert wurden 30,9 mg% Rhodan im gemischten Speichel mittels dieser Methode gefunden. Die Werte im jugendlichen Alter liegen etwas höher als im vorgeschrittenen. Allerdings ist hier nicht besonders zu veranschlagen, da ganz allgemein die Werte stark variieren. Messungen, die im Laufe desselben Tages vorgenommen wurden, zeigten stets, daß der Rhodangehalt morgens die niedrigsten Werte zeigt, dann langsam bis zum Mittag maximal ansteigt, um danach abzufallen und in den Abendstunden den Nüchternwert wieder zu erreichen. Außerdem ist festzustellen, daß auch im Verlaufe von 24 Stunden der Rhodangehalt nicht wesentlichen Schwankungen unterliegt (s. Tab. 14). Wenn diese von mir erhaltenen Werte mit denen in der Literatur vorliegenden verglichen werden, so ist deutlich erkennbar, daß die von Reissner gefundenen Zahlen, die die maximalen Werte aller bisherigen Untersuchungen darstellen, von den meinigen um ein beträchtliches überholt werden. Das mag vielleicht daran liegen, daß mit einer Verbesserung der Methode auch die Genauigkeit zunimmt. Und zwar sehe ich eine Verbesserung gegenüber der Reissnerschen Methode vor allem in der Verwendung des Duboscqschen Kolorimeters, das zweifellos gegenüber dem Bichner-Königsberger-Doppelkeilkolorimeter größere Vorzüge besitzt. Kontrollmessungen, die an Lösungen von bekannter Rhodankonzentration durchgeführt wurden, zeigten größtmögliche Genauigkeit mit einem maximalen Fehler von nur 0,05 mg%.

In größeren Versuchsreihen konnten die von Schneider, Krüger, Reissner, Reinhard, Albrecht, Beythin, Kissling u. a. vorliegenden Angaben bestätigt werden, daß die Rhodanwerte bei Rauchern ganz bedeutend höher lagen als bei Nichtrauchern. Während Albrecht und Beythin Zyan- und Rhodan im Speichel nachweisbar, konnte von Reissner experimentell in vitro festgestellt werden, daß nach Tabakrauchzufuhr keine nennenswert verstärkte Rhodanreaktion auftritt, so daß das Plus an Rhodan im Speichel von Rauchern keinesfalls unmittelbar auf den Rhodangehalt des Tabaks zurückzuführen ist. Meine Ergebnisse zeigten, daß der Genuß einer Zigarette den Rhodangehalt so gut wie gar nicht erhöht, während eine Zigarre sowie geringe perorale Zufuhr von Berhodan (I. G. Farbenindustrie) den Gehalt des Speichels an Rhodan ganz erheblich zu steigern vermögen. Die Ergebnisse in Tab. 21 stellen Mittelwerte größerer Versuchsreihen dar.

## 21. Einfluß von Tabak und Berhodan auf den Rhodangehalt des Speichels.

Speichel vorher	26,0 mg %
$\frac{3}{4}$ Stunden nach Rauchen einer Zigarette	26,3 „
2 „ „ „ „ „	26,6 „
Speichel vorher	18,6 mg %
$\frac{1}{2}$ Stunde nach Rauchen einer Zigarre	28,5 „
2 Stunden „ „ „ „ „	44,4 „
Speichel vorher	16,4 mg %
$\frac{1}{2}$ Stunde nach Einnahme von 0,25 g Berhodan	21,5 „
2 Stunden „ „ „ 0,25 g „	32,5 „
3 „ „ „ 0,25 g „	34,9 „
5 „ „ „ 0,25 g „	35,0 „

Tabelle 22. Physiologische Standard

	$p_H$	K mg%	Ca mg%	Mg mg%	Na mg%	Cl mg%	CNS mg%	PO <sub>4</sub> mg%	
Gesamtmittelwerte	7,153	55,90 <i>1,422</i>	12,14 <i>0,302</i>	1,290 <i>0,053</i>	69,95 <i>3,038</i>	74,23 <i>2,106</i>	30,9 <i>0,532</i>	13,51 <i>0,243</i>	93,6
8.—20. Lebensjahr	7,132	54,23 <i>1,387</i>	10,15 <i>0,297</i>	1,276 <i>0,052</i>	70,638 <i>3,071</i>	68,79 <i>1,937</i>	33,21 <i>0,571</i>	14,06 <i>0,244</i>	95,5
20.—40. Lebensjahr	7,143	54,66 <i>1,398</i>	11,80 <i>0,294</i>	1,265 <i>0,053</i>	65,653 <i>2,869</i>	61,30 <i>1,728</i>	29,57 <i>0,509</i>	12,05 <i>0,215</i>	89,2
40.—71. Lebensjahr	7,220	60,17 <i>1,539</i>	13,961 <i>0,348</i>	1,177 <i>0,048</i>	76,264 <i>3,316</i>	83,69 <i>2,388</i>	29,83 <i>0,513</i>	15,11 <i>0,283</i>	97,4

Erhöhte Rhodanwerte im Speichel nach Verabreichung von Rhodanpräparat und Zyan per os werden bereits von Miller, Lohmann, Low, Reissner angegeben, sodaß die Annahme berechtigt erscheint, daß die zyanhaltigen Salze in den Kreislauf gelangen, also nicht vom Speichel direkt adsorbiert, sondern indirekt durch den Speichel wieder ausgeschieden werden. Und weiter bemerkt Reissner die Beobachtung, daß der Prozentgehalt des Rhodans jeweilig vor und nach den Mahlzeiten am größten ist (was nach meinen Ergebnissen ebenfalls durchweg gefunden wurde), damit in Verbindung, daß dem Rhodan evtl. eine wichtige Aufgabe bei der Verdauungsarbeit zukommt. Diese Beobachtung stimmt mit den Untersuchungen Bittorfs und Falkenhausens über die diastatische Wirkung des Speichels in Einklang zu bringen. Nach Low wird dem Sulfozankalium im Munde eine günstige Wirkung zugesprochen, da es imstande sein soll, alle gelatinösen Substanzen, also auch die von den Bakterien auf den Zahnoberflächen gebildeten Häutchen gelatinösen Charakters, aufzulösen. Letztere Angaben wurden bisher nicht bestätigt.

### III. Biometrische Auswertung der Ergebnisse.

Zur Erleichterung der Übersicht seien im folgenden die für die einzelnen Elektrolyte gefundenen Mittelwerte in mg% in einer Tabelle zusammengestellt. Es sind ferner die Molekularäquivalente (Kursiv gedruckt) eingetragen und noch der Kationen- und Anionensumme sowohl das Verhältnis der Äquivalentgewinne zueinander ermittelt, als auch Berechnungen des K, Ca, Mg, Na und PO<sub>4</sub> auf 1 äquivalent Chlor angestellt. Die Berechnungen wurden deswegen auf Chlor orientiert genommen, weil es sich als das konstanteste Ingredienz herausstellte.

Diese in der vorstehenden Tabelle angeführten Werte dürften als physiologische Standardwerte betrachtet werden können. Es handelt sich in diesen ausgewählten 24 Fällen jedesmal um absoluten Ruhespeichel, der ohne jeglichen Reiz mindestens 2—3 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme unter Paraffinöl aufgefahrt und sofort verarbeitet wurde. Ferner sei betont, daß jede von diesen 24 Analysen bereits in sich einen Mittelwert von je 6 Einzeluntersuchungen derselben Person darstellt, so daß meines Erachtens nach eine genügend breite Basis vorhanden ist, um diese Werte als Norm- oder Standardwerte ansprechen zu können. Von den 24 Personen hatten während der Zeit der Speicheluntersuchungen keinerlei krankhafte Veränderungen der Mundschleimhaut und ihr Gebiß war seit dem letzten halben Jahr klinisch kariesfrei.



gemischten „Ruhespeichels“.

Anionen- name g%	Anionen- summe mg%	auf 100 aequival. Cl kommen					Verhältnis der Äquivalentgewichte					
		K	Ca	Mg	Na	PO <sub>4</sub>	Na/K	Na/Cl	K/Ca	PO <sub>4</sub> /Ca	Ca/Mg	K/PO <sub>4</sub>
322	4,408	67,85	14,34	2,527	144,3	11,54	2,126	1,443	4,732	0,804	5,69	5,881
307	4,311	71,61	15,33	2,684	159,5	12,60	2,214	1,595	4,670	0,821	5,712	5,684
314	3,911	80,90	17,01	3,067	166,0	12,44	2,052	1,660	4,755	0,920	5,547	6,502
251	4,781	64,45	14,57	2,010	139,8	11,85	2,155	1,398	4,422	0,813	7,250	5,438

Um aber aus diesen gefundenen Analysenwerten Rückschlüsse auf irgendwelche biologischen Prozesse, sei es innerhalb der Mundhöhle oder ganz allgemein des Gesamtorganismus, ziehen zu können, wurde als Grundlage für alle weiteren Forschungen eine genaue Verarbeitung nach biometrischen Grundsätzen vorgenommen. Zu diesem Zwecke wurde die Aufstellung einer Häufigkeitsreihe, wie Martin für seine Messungen vorgeschlagen hat, notwendig, die in der Weise erfolgte, daß man die Anzahl der Varianten bestimmt, welche die gleiche Maßzahl haben, wobei man vom niedrigsten Wert zum höchsten fortschreitet. Die Berechnung des arithmetischen Mittels, das mit „M“ bezeichnet wird, erfolgt nun in der Weise, daß man die einzelnen Frequenzen mit den entsprechenden Messengrößen multipliziert, die gefundenen Produkte addiert und die Summe durch die Anzahl der Fälle dividiert. Ein Beispiel mag die in den Tab. 5—8 des Mangs eingetragenen Werte näher erläutern:

1. Maß mg%	2. Häufigkeit	3. 1 × 2	4. Abweichung von M	5. 4 <sup>2</sup>	6. 2 × 5
40,820	2	81,640	15,08	227,406	454,812
44,850	1	44,850	11,05	122,102	122,102
47,770	1	47,770	8,13	66,096	66,096
48,810	1	48,810	7,09	50,268	50,268
50,170	1	50,170	5,73	32,83	32,830
50,700	1	50,700	5,20	27,040	27,040
50,830	1	50,830	5,07	25,705	25,705
54,925	1	54,925	0,975	0,950	0,950
56,610	1	56,610	0,71	0,504	0,504
57,525	1	57,525	1,62	2,624	2,624
58,045	2	116,090	2,14	4,579	9,158
59,080	2	118,160	3,18	10,112	20,224
60,645	2	121,290	4,74	22,468	44,136
60,905	1	60,905	5,00	25,00	25,000
61,230	1	61,230	5,33	28,409	28,409
62,205	1	62,205	6,30	39,69	39,690
63,700	2	127,400	7,80	60,84	121,680
65,260	2	130,520	9,36	87,609	175,218
	24	1341,650			1246,446

Arithmetisches Mittel  $M = \frac{1341,65}{24} = 55,90 \text{ mg\%}$ ,

$\sigma = \sqrt{\frac{1246,446}{24}} = 7,206,$



$$m = \frac{7,206}{\sqrt{24}} = 1,471,$$

$$v = \frac{100 \cdot 7,206}{55,90} = 12,90\%.$$

Um nun weiter einen Überblick zu bekommen, ob die Anzahl der beobachteten Einzelfälle, d. h. der Varianten, groß genug ist, um ein wissenschaftlich zulässiges arithmetisches Mittel, d. h. den typischen Durchschnitt zu ergeben, wird der „mittlere Fehler“ des arithmetischen Mittels =  $m$  nach der Formel berechnet

$$m = \pm \frac{\sigma}{\sqrt{24}}.$$

$\sigma$  stellt hier als mittlere oder stetige Abweichung das Maß der Variabilität dar, bei welcher alle Varianten, selbst die extremsten, einen Einfluß ausüben. Sein Wert beruht darauf, daß durch eine Zahl ersichtlich gemacht werden kann, ob die individuellen Werte dicht gedrängt oder weit zerstreut um das arithmetische Mittel gelagert sind. Die Berechnung von  $\sigma$  aus der Häufigkeitsreihe geht aus dem Schema hervor.

Die Genauigkeit des arithmetischen Mittels verhält sich also proportional der Quadratwurzel aus der Zahl der Einzelfälle, daher erscheint es zweckmäßig, neben jedem arithmetischen Mittel auch dessen mittleren Fehler mit anzugeben, was in den Tabellen mit  $M + m$  bezeichnet wurde. Je kleiner also  $m$  ist, „um so enger liegen die Grenzen, innerhalb welcher das typische arithmetische Mittel schwanken wird, um so näher kommt das aus dem angefallenen Material berechnete arithmetische Mittel dem wahren, aus einer unendlich großen Reihe berechneten Mittelwerte gleich“ (Martin).

Will man nun die Variabilität der verschiedenen Elektrolyte miteinander vergleichen, so ist es zweckmäßig, noch ein relatives Variabilitätsmaß, den Variationskoeffizienten zu berechnen, der die Abweichung in Prozenten vom arithmetischen Mittel angibt und somit ein brauchbares Vergleichsmaß darstellt.

Die Berechnung erfolgt nach der Formel

$$v = \frac{100 \cdot \sigma}{M}.$$

Um aus allen Speicheluntersuchungen, die in Zukunft noch durchgeführt werden, einen Nutzen ziehen zu können, erscheint es mir unumgänglich notwendig, daß die Berechnungen der Resultate auf dieser angegebenen Basis erfolgen. Es ist dann unschwer, Vergleiche der Resultate der einzelnen Beobachter durch Berechnung von „relativen“ Häufigkeitsreihen anzustellen und alle Ergebnisse auf einer einheitlichen Basis für die Physiologie oder Physio-Pathologie nutzbar zu machen (s. Tab. 5—8 im Anhang).

#### IV. Speichelzusammensetzung während der Gravidität.

Gleich mit dem Beginn der Schwangerschaft treten an den Körper der erwachsenen Frau eine Menge neuer Forderungen heran, denen der Gesamtorganismus nur durch weitgehendste Umstellung des Stoffwechsels gerecht zu werden vermag. Wie der Organismus auf diese plötzliche Mehrleistung sich einzustellen vermag,

aus den sehr umfangreichen Untersuchungen über diese Frage hervor, die allgemeinen Schluß zulassen, daß der schwangere Organismus die größte Samkeit übt, um den Fötus ernähren zu können und daher die Verbrennungen Ausscheidungen bei unverändert oder evtl. gesteigerter Nahrungsaufnahme auf ein Minimum einschränkt. Diese Umstellung erfolgt wohl in der Haupt- auf dem Wege des vegetativen Nervensystems, die sich aber nicht immer Störung abspielt. Die sehr häufigen Stoffwechselstörungen, selbst bei voll- men gesunden und kräftigen Frauen während der Schwangerschaft, von denen Tetanie, Spasmophilie, das Schwangerschaftsödem, ferner Osteomalazie und Megalgie eine große Rolle spielen, lassen verstehen, daß man dem Mineral- wechsel während der Gravidität von jeher die größte Aufmerksamkeit zu- te. Selbstverständlich lag es nahe, zunächst das Blut als den Mittler zwischen erlichem und kindlichem Organismus auf seinen Mineralgehalt während dieser zu untersuchen. Es ergab sich ganz allgemein, daß während der Gravidität Mineralgehalt in erheblichem Maße von der Norm abweicht, daß nicht nur absolute Menge der einzelnen Salze, sondern auch ihr Mischungsverhältnis ichtlichen Schwankungen unterliegt.

Die sehr häufigen Krankheitserscheinungen innerhalb der Mundhöhle, sei es, es sich um vermehrtes Auftreten von Karies oder Neigung zu Gingivitiden

Tabelle 23. Speichelzusammensetzung während der Gravidität.

Zeit der Entnahme	Wann zuletzt gegessen	Menge Speichel pro Std. pro Tag cem	Gravide in welch. Monat	HCO <sub>3</sub>	p <sub>H</sub>	K mg%	Ca mg%	Mg mg%	Na mg%	Cl mg%	CNS mg%	PO <sub>4</sub> mg%
3,10 <sup>0</sup> —8,50 <sup>0</sup>	6,30 <sup>0</sup> morg.	49,5 1188	6.	63,21	6,98	51,93	5,70	0,825	—	—	15,92	4,1 12,70
8,10 <sup>0</sup> —9,00 <sup>0</sup>	6,30 <sup>0</sup> morg.	31,0 744,0	7.	57,95	7,25	68,13	5,70	0,642	—	—	24,6	4,3 13,16
7,15 <sup>0</sup> —10,20 <sup>0</sup>	7 <sup>0</sup> morg.	14,7 417,6	7.	79,0	7,22	63,44	5,80	2,240	64,745	72,693	16,2	5,5 16,87
8,15 <sup>0</sup> —10,20 <sup>0</sup>	7 <sup>0</sup> morg.	14,7 417,6	8.	76,39	7,09	69,03	6,03	2,120	74,750	79,43	20,7	5,9 18,12
9,25 <sup>0</sup> —10,05 <sup>0</sup>	6,30 <sup>0</sup> morg.	28,5 684	7.—8.	52,68	6,88	43,29	6,26	2,650	43,700	65,60	22,2	4,9 14,77
10,05 <sup>0</sup> —10,50 <sup>0</sup>	7 <sup>0</sup> morg.	8,0 192	10.	79,0	6,64	63,44	6,96	1,580	59,800	72,693	44,44	6,4 19,59
10,10 <sup>0</sup> —10,15 <sup>0</sup>	7 <sup>0</sup> morg.	—	9.—10.	60,58	6,97	49,27	5,80	1,530	65,780	65,757	52,6	7,4 22,77
11,10 <sup>0</sup> —10,00 <sup>0</sup>	7 <sup>0</sup> morg.	19,5 468	9.—10.	76,39	7,43	52,13	6,49	1,370	82,225	72,693	37,0	5,5 16,87
12,10 <sup>0</sup> —9,12 <sup>0</sup>	6,30 <sup>0</sup> morg.	—	9.	57,95	7,10	66,10	5,70	0,675	—	—	13,3	4,0 12,24
1,20 <sup>0</sup> —10,10 <sup>0</sup>	6,30 <sup>0</sup> morg.	21,6 518,4	9.—10.	60,58	6,89	40,75	7,66	1,360	42,320	65,601	20,30	5,6 17,14

handelt, gab Veranlassung, in diesem Rahmen den Speichel auf seine anorganische Zusammensetzung hin zu untersuchen.

Bei Durchsicht der Ergebnisse ist sofort eine augenfällige Verminderung des Kalziumgehaltes um 50% der physiologisch normalen Werte festzustellen, gleichzeitig mit einer Vermehrung des Magnesiums (im Gegensatz zu den Parodontosen und der Phosphatose). Im 9. und 10. Monat der Gravidität fallen von 5 Analysen drei sehr hohe Rhodanwerte auf, die nach der angeführten Theorie offenbar den erhöhten Eiweißstoffwechsel in den letzten Monaten der Schwangerschaft zustande kommen.

Tabelle 24.

$n = 10$	$M \pm m$	$V$	$\sigma$
HCO <sub>3</sub>	66,37 $\pm$ 3,03	14,50 %	9,624
K	56,75 $\pm$ 3,15	17,59 %	9,983
Ca	6,18 $\pm$ 0,065	3,31 %	0,205
Mg	1,505 $\pm$ 0,064	13,57 %	0,204
Na	61,90 $\pm$ 0,518	22,18 %	13,73
Cl	70,63 $\pm$ 1,862	6,95 %	4,935
CNS	26,74 $\pm$ 3,987	47,27 %	12,64
PO <sub>4</sub>	16,42 $\pm$ 0,827	15,95 %	2,623
p <sub>H</sub>	7,05 $\pm$ 0,009	0,43 %	0,03

Tab. 24 zeigt brauchbare Vergleichswerte. Der Bikarbonat- und Natriumgehalt sind wesentlich herabgesetzt. Die mittlere oder stete Abweichung zeigt, wie auch beim Rhodan (infolge der drei hohen Werte), keinen größeren Unterschied von den physiologisch normalen Werten, während der Variationskoeffizient stark differiert.

Während der Kalziumspiegel im Blut nach Fläicher in zwei Drittel der ersten Hälfte der Gravidität erhöht war, was auch von Hoffström bestätigt wurde, und durch vermehrte Kalkresorption aus der Nahrung, ist der Gehalt an Calcium im

Tabelle 25.

	p <sub>H</sub>	K mg%	Ca mg%	Mg mg%	Na mg%	Cl mg%	CNS mg%	PO <sub>4</sub> mg%	H <sub>2</sub> O mg%
Physiologisch normal . . . . .	7,153	55,90 1,429	12,14 0,302	1,290 0,053	69,95 3,038	74,23 2,106	30,90 0,532	13,51 0,243	10,15 0,177
Während der Gravidität . . . . .	7,05	56,75 1,451	6,18 0,154	1,505 0,0618	61,90 2,691	70,63 1,994	26,74 0,460	16,423 0,286	10,15 0,177
Bei Parodontosenerkrankung . . . . .	7,08	63,56 1,620	8,44 0,210	0,740 0,0304	96,26 4,185	79,23 2,234	32,19 0,554	10,15 0,177	10,15 0,177

gemischten Speichel um die Hälfte herabgesetzt, ein Zeichen dafür, daß der mütterliche Organismus mit seinen Mineralsalzen streng zu wirtschaften vermag und die Ausscheidung der lebenswichtigsten Elektrolyte durch die Speicheldrüsen für den kindlichen Organismus bis auf ein Minimum einschränkt.



## V. Speichelzusammensetzung bei Parodontosen.

trotz der grundlegenden histopathologischen und röntgenologischen Untersuchungen des Parodontiums sowie der ungeheuer angewachsenen Literatur über Genese der Parodontosen sind wir leider heute immer noch nicht in der Lage, einwandfreie und befriedigende Erklärung dieses Krankheitskomplexes zu geben. Wenn auch in den letzten Jahren alles versucht wurde, um auf Grund weiterer wissenschaftlicher Forschung dem eigentlichen Wesen und inneren Ursprung dieser Erkrankung näherzukommen, so blieb es therapeutisch bisher nur bei einer Beseitigung der Symptome und einer Beeinflussung des lokalen Krankheitsherdes, sei es durch symptomatische oder spezifische Behandlung (Langer-Sachs) oder durch radikal-chirurgische Maßnahmen (Neumannmann). Darüber aber herrscht heute wohl allgemeine Übereinstimmung, daß für die Entstehung der Parodontosen außer den bekannten exogenen Faktoren, wie wir in der Hauptsache im Zahnstein, einer evtl. Überlastung, in infektiösen und funktionellen Reizen zu suchen haben, eine endogene Krankheitsbereitschaft vorhanden sein muß. Diese endogene Komponente, wie sie das Krankheitsbild im Ausdruck starker konstitutioneller Störungen beherrscht, z. B. bei Lues, Diabetes, Anämie, Leukämie, Gicht, Rheuma, Arthritis urica, chronischen Erkrankungen des Herzens, der Leber, der Nieren usw., kann wohl nach unseren bisherigen Erfahrungen einen prädisponierenden Faktor einer derartigen parodontalen Erkrankung darstellen, aber nicht ohne lokale (exogene) Reize zu einem Ausfesterwerden der Parodontose führen.

Wenn an dieser Stelle die regressiven Vorgänge am Alveolarfortsatz im Sinne der Abheilung von den Entzündungserscheinungen, also die Alveolaratrophie von der Parodontalpyorrhöe getrennt werden soll, so geschieht das aus einem besonderen Grunde: Entzündliche Vorgänge können sich bekanntlich bei jeder beliebigen Konstitution entwickeln. Bei Betrachtung der Fälle hingegen, bei denen es sich um atrophische Vorgänge am Alveolarfortsatz handelt, liegt wohl fast immer eine konstitutionelle Komponente zugrunde, ja es ist sogar möglich, daß wir

Tabelle 25.

Anionen- summe	Anionen- summe	Auf 100 äquival. Cl kommen					Verhältnis der Äquivalentgewichte					
		K	Ca	Mg	Na	PO <sub>4</sub>	Na/K	Na/Cl	K/Ca	PO <sub>4</sub> /Ca	Ca/Mg	K/PO <sub>4</sub>
22	4,408	67,85	14,34	2,528	144,3	11,54	2,126	1,443	4,732	0,804	5,69	5,881
58	3,827	72,77	7,723	3,109	139,1	14,34	1,898	1,391	9,422	1,857	2,358	5,073
45	4,243	61,28	9,400	1,361	187,3	7,923	3,057	1,873	6,519	0,842	6,908	7,734

hier mit einem ganz bestimmten Konstitutionstyp zu tun haben. Diese Frage der Konstitution im Hinblick auf das Parodontosenproblem wird in neuerer Zeit durch die Arbeitsgemeinschaft für Parodontosenforschung bearbeitet.

Während Möhring bereits die Beobachtungen von Sachs bestätigte, daß der depressive Typus, der leicht an melancholischen Zuständen leidet, aber körperlich sich durchaus wohl befindet, zur Parodontose neigt und hier-



Tabelle 26. Paradentosen-Ruhespeichel.

Nr.	Alter	Zeit der Entnahme	Anzahl der cem Speichel in dieser Zeit	Wann zuletzt gegessen?	Menge Speichel pro Stunde Tag + cem	HCO <sub>3</sub> mg%	PH	K mg%	Ca mg%	Mg mg%	Na mg%	Cl mg%
1.	22 $\frac{1}{2}$	10,15 <sup>0</sup> —10,40 <sup>0</sup>	10	7,30 <sup>0</sup> morgens	24 576	0,32 84,2	7,29	55,90	6,76	—	—	66,51
2.	22 $\frac{1}{2}$	4,10 <sup>0</sup> —4,45 <sup>0</sup>	10	1 <sup>0</sup> Mittagess.	17 408	0,3 79,0	7,44	65,39	7,90	—	—	69,58
3.	24	3,15 <sup>0</sup> —4,15 <sup>0</sup>	15	12 <sup>0</sup> Mittagess.	15 360	—	6,88	49,335	5,34	0,847	—	88,65
4.	25	11,00 <sup>0</sup> —11,30 <sup>0</sup>	20	8,30 <sup>0</sup> morgens	40 960	0,32 84,2	7,22	37,30	11,04	1,005	65,60	65,60
5.	27	11,30 <sup>0</sup> —12,30 <sup>0</sup>	23	7,30 <sup>0</sup> morgens	23 552	0,30 79,0	7,00	62,01	7,06	0,746	104,60	88,7
6.	27	11,30 <sup>0</sup> —12,30 <sup>0</sup>	20	8,30 <sup>0</sup> morgens	34 816	0,29 76,4	7,00	91,65	10,1	—	103,385	89,30
7.	27	10,40 <sup>0</sup> —11,25 <sup>0</sup>	36	7 <sup>0</sup> morgens	48 1152	—	6,90	60,58	7,07	0,485	103,38	88,70
8.	30	10,35 <sup>0</sup> —11,35 <sup>0</sup>	14	7,30 <sup>0</sup> morgens	14 336	0,23 60,5	6,85	66,41	7,12	0,936	89,44	70,92
9.	31	9,55 <sup>0</sup> —10,22 <sup>0</sup>	17,5	7 <sup>0</sup> morgens	39 936	0,28 73,7	6,90	53,365	11,1	0,326	104,60	85,70
10.	31	9,10 <sup>0</sup> —9,55 <sup>0</sup>	37	7 <sup>0</sup> morgens	49,5 1188	0,29 76,4	7,02	59,86	7,57	0,326	108,40	90,80
11.	35	4,15 <sup>0</sup> —5,15 <sup>0</sup>	11	1 <sup>0</sup> Mittagess.	11 264	—	7,25	79,305	9,24	0,379	109,70	75,39
12.	35	10,15 <sup>0</sup> —11,15 <sup>0</sup>	12	7,30 <sup>0</sup> morgens	12 288	0,3 79,0	7,13	84,30	7,99	0,917	123,625	84,36
13.	43	10,40 <sup>0</sup> —11,10 <sup>0</sup>	15	8,30 <sup>0</sup> morgens	30 720	0,38 100,09	7,27	62,20	11,9	—	71,645	71,57
14.	52	10,40 <sup>0</sup> —11,20 <sup>0</sup>	26	7 <sup>0</sup> morgens	39 336	0,28 57,95	6,82	63,27	9,3	1,124	111,205	85,19
15.	52	10,30 <sup>0</sup> —11,15 <sup>0</sup>	23,5	7 <sup>0</sup> morgens	31,3 751,2	—	6,97	61,145	8,28	0,804	66,01	70,92
16.	52	—	—	—	—	0,28 73,7	6,99	51,15	7,38	1,200	72,09	62,09
17.	—	11,05 <sup>0</sup> —12,00 <sup>0</sup>	17	—	19,4 665,6	0,34 89,5	7,30	77,22	8,32	0,525	113,965	92,79

aus evtl. Beziehungen zur inneren Sekretion abzuleiten wären, berichten M... und auch Reinmöller über Beziehungen zwischen Thymus-, Testis- und Ovae... abbau zu Paradentosen. Und weiter finden wir ein gehäuftes Auftreten... Paradentosen als Begleitsymptom bei den verschiedensten anderen Stoffwe...

nkungen, sodaß die Vermutung nicht allzu fern liegt, die Parodontosen allgemein als eine Stoffwechselerkrankung ansprechen zu können. Durch mmung des Grundumsatzes und der spezifisch-dynamischen Nahrungsmittel- ung bei einer Anzahl an Parodontose erkrankten Patienten konnte Wein- n in neuerer Zeit feststellen, daß zwar der Grundumsatz in der Mehrzahl r Fälle normal oder nur um ein geringes gesteigert oder herabgesetzt war, dagegen die spezifisch-dynamische Nahrungsmittelwirkung deutlich herab- zt war. Diese Befunde ergaben sich aber nur bei den an diffuser Atrophie (tlieb) erkrankten Patienten, während alle anderen mit einer Gingivitis osa oder Schmutzpyorrhöe behafteten normale Stoffwechselbefunde zeigten. eine Untersuchungen über die quantitative anorganische Zusammensetzung peichels bei Parodontosen förderten nun sehr interessante Ergebnisse zutage. urden hierfür nur ganz ausgesprochene Fälle gewählt, die etwa dem Bilde iffusen Atrophie nach Gottlieb entsprachen. Es zeigte sich eine mehr weniger starke Lockerung sämtlicher Zähne sowie die bekannten Erschei- en im Bereiche des Paradentiums.

1 der Tab. 26 sind die ausführlichen Protokolle der einzelnen Analysen ein- gen, die vor allem in der Ca- und  $\text{PO}_4$ -Rubrik eine erhebliche Differenz len von mir gefundenen physiologisch-normalen Werten aufweisen, was etwas ichter noch aus der Tab. 25 hervorgeht. Auch die biometrische Auswertung ausgezeichnete Vergleichswerte (Tab. 27).

Tabelle 27.

$n = 17$	$M \pm m$	$v$	$\sigma$
$\text{HCO}_3$	77,97 $\pm$ 2,92	13,50 %	10,56
K	63,56 $\pm$ 3,17	20,5 %	13,07
Ca	8,44 $\pm$ 0,423	20,6 %	1,746
Mg	0,740 $\pm$ 0,0079	3,8 %	0,0286
Na	96,26 $\pm$ 4,964	19,32 %	18,60
Cl	79,23 $\pm$ 2,62	12,7 %	10,11
CNS	32,19 $\pm$ 3,92	47,0 %	15,14
$\text{PO}_4$	10,15 $\pm$ 0,59	23,5 %	2,391
$p_{\text{H}}$	7,08 $\pm$ 0,004	0,26 %	0,018

as ihnen allen geht ganz eindeutig hervor, daß bei den Parodontosen der (halt etwas, Na sogar stark erhöht ist, dagegen Ca und  $\text{PO}_4$  um etwa 25%, ogar 40% erniedrigt sind. Infolgedessen findet sich auch eine Verschiebung erhältnisses der Äquivalentgewichte zueinander. Bei den Parodontosen use Atrophie) handelt es sich also um eine grundsätzliche Än- rung des Elektrolytgehaltes im Vergleich zum normalen Speichel.

ie bereits an anderer Stelle hervorgehoben wurde, verläuft die Rachitis im gaeinen unter dem Bilde einer phosphorarmen Form, d. h. wir finden im erum stark herabgesetzte Phosphatwerte, sodaß diese Phosphatverminderung reudenberg als das Problem der neueren Rachitisforschung bezeichnet re. Wenn allerdings bis heute auch noch keine Speichelkalzium- und Phosphor- sen bei der Rachitis vorliegen, so läßt sich doch wohl mit größter Wahr- elichkeit vermuten, daß der Phosphorgehalt wie im Serum so auch im Speichel ndert ist. Wenn wir nun weiter bei den Parodontosen in der Hauptsache

eine gestörte Ca-Phosphor-Bilanz finden, so ist vielleicht daraus abzuleiten, entsprechend den Versuchen von Howland hier eine gestörte Resorption. Kalzium und Phosphaten maßgebend ist. Über die Bedeutung des Magnesium im Organismus wissen wir bisher nur sehr wenig; auf den sehr niedrigen Gehalt selbst im normalen Speichel gegenüber dem Blute wurde bereits aufmerksam gemacht. Bei den Parodontosen finden wir sogar noch eine starke Herabsetzung der Magnesiumwerte bis auf 0,740 mg% gegenüber 1,177 mg% unter normalen Verhältnissen zwischen dem 40. und 70. Lebensjahr. Diese Verminderung ist in Anbetracht der an und für sich schon geringen Menge an Mg eine sehr beträchtliche und läßt auf eine pathologische Veränderung der Zellen resp. der endogenen Drüsen schließen. Ullrich macht bereits auf eine sehr interessante Feststellung aufmerksam, die sich bei Analysen von stark kariösen Zähnen sowie solchen, die von an Rachitis und Parodontose erkrankten Personen stammen. Bei diesen drei angeführten Krankheitsmanifestationen wiesen die Zähne ein großes Minus an Ca, aber ein starkes Plus an Magnesium bei der Analyse auf. Eine Feststellung, die für die Ätiologie der Zahnkaries und Alveolarpyorrhoe vielleicht von großer Bedeutung sein kann und deutlich zeigt, daß diese Erkrankungen im innigen Zusammenhang mit der Gesundheit und Physiologie des Gesamtorganismus stehen.

Es ist aber noch ein weiteres sehr wichtiges Ergebnis aus der Tab. 2. Charakteristikum für die Parodontosen abzulesen. Wir finden nämlich bei den Parodontosen ein erhebliches Plus an Kationen. Während im allgemeinen unter physiologischen Verhältnissen das Anionendefizit etwa rund 0,400 Moleküle äquivalent ausmacht, beträgt es bei den Parodontosen fast das Fünffache, nämlich 1,89, d. h. wir haben offenbar eine Mehrausscheidung von Kationen, von denen neben Kalium der Hauptteil auf das Natrium fällt, das außerordentlich hohe Werte zeigt, während Ca und Mg, wie bereits oben erwähnt, stark vermindert sind. Welche Bedeutung diese Kationenmehrausscheidung für die biologischen Vorgänge hat, läßt sich im Augenblick noch nicht übersehen. Auffallend ist jedenfalls hierzu die Kalzium- und Phosphatverminderung, während wir auf der anderen Seite fast täglich bei den an Parodontosen Erkrankten eine besondere Neigung zur Zahnsteinbildung feststellen können.

Bei der Betrachtung der Löslichkeit der Kalksalze unter Berücksichtigung der Aktivitätstheorie ist eine starke Erhöhung der Löslichkeit von Kalziumphosphat und Kalziumkarbonaten in Neutralsalzlösungen zahlenmäßig erklärlich. Kalksalze Versuche zeigen noch eine Besonderheit der Beeinflussung eines Systems durch  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  als Bodenkörper durch Zugabe von Na und Kaliumchlorid. Bei geringer Zugabe von Neutralsalz verschob nämlich unter Erhöhung der Löslichkeit des sehr schwer löslichen Salzes das  $p_{\text{H}}$  nach der alkalischen Seite, während stark konzentrierte Zugaben die H-Ionenkonzentration erhöhte. Wenn auch nicht in allen Fällen, so ist doch in mehreren ein gewisser Parallelismus im Speichel mit diesen Untersuchungen festzustellen. Es wäre immerhin denkbar, daß dieses Meersalz Kochsalz im Speichel — das Natrium ist ja wohl in der Hauptsache an Cl gebunden — die Löslichkeit der Kalksalze erhöht und damit seine besondere Aufgabe erfüllt.

Die Auffindung der negativ geladenen Adsorptionsverbindung des Kalziums im Speichel führte dazu, einen Teil der gebräuchlichsten Zahnpasten auf



ptionsfähigkeit und evtl. Schädlichkeit hin zu prüfen, um auf diesem Wege Problem der Zahnsteinbildung näherzukommen. Es sei in diesem Zusammenhang auf die Ausführungen von Herrenknecht und Becks (Mundheilkunde, Fortschritte der Zahnheilkunde 1928) verwiesen. Es sollen hier nur die wesentlichen Tatsachen hervorgehoben werden, die sich aus den Untersuchungen ableiten lassen. Der größte Teil der Pasten und Pulver erhöht den Kalziumgehalt des Speichels vorübergehend. *Auf Grund mehrerer Gefrierversuche ist Speichel nicht mehr als übersättigte Lösung anzusprechen.* Erst durch die Pasten enthaltenen löslichen Ca-Salze wird er übersättigt. Dadurch ist die Möglichkeit einer beschleunigten Ausfällung von Kalksalzen gegeben. In allen untersuchten Pasten zeigte nur eine Paste keine Löslichkeitserhöhung. Außerdem eine deutliche Adsorptionswirkung, während die reine Schlämme ( $\text{CaCO}_3$ ) keinerlei Veränderung des Speichels verursachte, wie wir dies auch bei unseren ersten Schüttelversuchen sahen. Daraus ergab sich, daß es nicht gleichgültig ist, welche von den zahlreichen Mundkosmetika verwendet werden. Das idealste Mittel scheint vorläufig immer noch die reine Schlämme zu sein, die sich auch nach unseren klinischen Erfahrungen in bezug auf Verhütung von Zahnsteinbildung am besten bewährt hat. Alle anderen Mittel, die mehr oder weniger mit einer Zahnbürste in die Zahnfleischtaschen täglich eingerieben werden und dort sowie in den Retentionsnischen entweder infolge von Übersättigung des Speichels an Kalksalzen und stattfindender  $\text{CO}_2$ -Abgabe bald zu Niederschlagsbildung führen oder als positive Adsorbentien in Verbindung mit Kolloiden ebenfalls zu einer Ausfällung von Kalksalzen beitragen, scheinen für die tägliche Mundpflege ungeeignet zu sein. Vor allem gilt dies für die Parodontopathien, bei denen es in den meisten Fällen zur Bildung von pathologisch veränderten Zahnfleischtaschen kommt und mehr als alle anderen Erkrankungen der Mundhöhle durch seröse Exsudation und damit erhöhter Kolloidanreicherung Gelegenheit zu Niederschlagsbildungen geben. Gerade hier erscheint es angezeigt, Zahnpasten ganz fern zu halten und die Mundpflege durch kräftiges Ausbürsten der Interdentalräume und Retentionsstellen für Speisereste sowie vor allem durch den Ansatz des Zahnsteins so überaus gefährlichen Zahnfleischtaschen durch die Atomiseurs oder Dentaloptimax zu ersetzen.

Als therapeutische Schlußfolgerung aus den vorliegenden Untersuchungen ergibt sich eine Stärkung des Gesamtorganismus, die sich vor allen Dingen dahin äußern muß, dem betr. Patienten eine entsprechende kalzium- und phosphatreiche Diät zu verordnen, die durch medikamentöse Beigaben unterstützt werden kann. Ferner sollte die Resorptionsmöglichkeit und Nutzbarmachung dieser Kalksalze für den ganzen Körper, insbesondere aber für den Alveolarfortsatz, gefördert werden. Und wenn wir heute schon so weit sind, daß wir sagen können, daß als Ernährung für das Kleinkind die Aufnahme von P und Ca dann die beste ist, wenn Ca und P in der Nahrung im selben Verhältnis wie in der Frauenmilch vorhanden ist (= 1,31), so wird sich auch hier durch experimentelle Forschung herausfinden lassen, daß bei regelmäßiger Zufuhr dieser Salze eine Bilanzgleichung dieser Speichelbestandteile auf den normalen physiologischen Zustand herbeiführt. Sobald hierüber handgreifliche Ergebnisse unsererseits vorliegen, wird darüber berichtet werden. Schon heute kann gesagt werden, daß



bei regelmäßiger Verabreichung von Kalkpräparaten (Kalzan) in schweren Fällen von Parodontosen, natürlich neben peinlichster Entfernung aller erreichbaren Konkreme und unter Beachtung aller hier angeführten Pflege-mittel, sich eine erstaunliche Festigung nach  $\frac{1}{2}$  Jahre zeigte. Selbstverständlich ist die Zahnfleischtasche hierdurch nicht zu beseitigen, sie wird weiterhin *Locus minoris resistentiae* bleiben, aber die Knochentaschen können sich um Ablagerungen wieder verengern und dadurch sowie durch Kräftigung des Alveolfortsatzes der Halteapparat des Zahnes gestärkt und gestützt werden.

## Zusammenfassung.

Für die Bestimmung der Ionenverhältnisse im gemischten Reiz- und Ruhespeichel werden genaue Richtlinien angegeben sowie eine eingehende und zuverlässige Mikroanalysetechnik.

Auf Grund eines größeren Materials werden Norm- oder Standardwerte für anorganischen Bestandteile des physiologisch normalen Ruhespeichels festgestellt, die eine Vergleichsmöglichkeit für pathologische Veränderungen bieten. Die Werte stellen das arithmetische Mittel von 144 verschiedenen Untersuchungen dar:

a) Kationen: Ca = 12,13 mg%	b) Anionen: Cl = 74,68 mg%
K = 55,89 „	PO <sub>4</sub> = 13,6 „
Na = 69,88 „	CNS = 30,9 „
Mg = 1,29 „	HCO <sub>3</sub> = 93,16 „

c) Wasserstoffionenkonzentration = 7,153.

Der hierfür zur Untersuchung gelangte Speichel stammt von Personen aller Altersstufen.

Bei Einteilung in drei große Altersklassen zeigt sich ein bemerkenswerter Unterschied in der quantitativen anorganischen Zusammensetzung des Speichels: Der Kationen- und Anionengehalt des Speichels nimmt im mittleren Lebensalter nach Beendigung des Körperwachstums ab und steigt mit zunehmendem Alter wieder stark an. Das macht nach den vorliegenden Untersuchungen eine Ausnahme, da es in der Jugend auf ständig zunimmt.

Die Änderung der Elektrolytzusammensetzung des Speichels im Laufe eines Tages:

a) Kalium und Rhodan zeigen die niedrigsten Werte morgens im Nüchterspeichel, sodann langsam ansteigend erreichen sie in den Nachmittagsstunden die höchsten Werte, um über Nacht wieder bis auf den niedrigsten Stand abzufallen.

b) Kalzium und Chlor gehen invers mit dem Kalium und Rhodan und zeigen morgens und über Nacht die höchsten Werte. Tagsüber bleiben sie ziemlich konstant.

c) Magnesium zeigt nüchtern die niedrigsten Werte, um mittags seinen Höchststand zu erreichen und dann langsam wieder abzufallen. Es scheint so, als ob Magnesium invers mit dem Natrium gehe.

d) Phosphor, HCO<sub>3</sub> und  $p_{\text{H}}$  sind am wenigsten konstant; für sie ließ sich eine bestimmte Gesetzmäßigkeit nicht finden, wie sie für die Elektrolyte in a—c festgestellt werden konnte.

Auf Grund von Schüttelversuchen sowie durch Dialyse und Ultrafiltration wurde im Speichel eine negativ geladene und durch positive Adsorption

bentien adsorbierbare Kalziumverbindung gefunden, die bereits von Klinker für das Blutserum beschrieben wurde.

6. Von den 12,0 mg% Ca im gemischten Speichel sind unter physiologisch normalen Verhältnissen 2 mg% echt ionisiert (Fraktion 1); dialysierbar 6—7 mg% und der Überschuss über dem echt ionisierten Teil (Fraktion 2) beträgt 4—5 mg%.

7. Die Kalziumkonzentration verhält sich umgekehrt proportional zur produzierten Menge Speichel.

8. Durch besondere Versuchsanordnung konnte festgestellt werden, daß es im Speichel nicht, wie bisher angenommen wurde, um eine an  $\text{CaCO}_3$  und  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$  übersättigte Lösung handelt.

9. In zwei Fütterungsversuchen wurde festgestellt, daß

a) Nach 5 g KCl der Gehalt des Speichels an Kalium zunächst fällt, um nach 4 Stunden leicht anzusteigen, während der Ca- und Mg-Spiegel fallen. Auf der anderen Seite erfahren Chlor und Rhodan sowie die Wasserstoffionenkonzentration eine deutliche, vorübergehende Zunahme.

b) Nach 5 g  $\text{NaHPO}_4$  erfolgt eine Steigerung des Na und  $\text{PO}_4$  auf der einen Seite und parallel damit eine Senkung des Chlor-Gehaltes auf der anderen Seite.

10. Der Kaliumgehalt des Speichels zeigt nur im Laufe desselben Tages eine gewisse Konstanz, während mit der Zeit größere Schwankungen auftreten. Außerdem bestehen große individuelle Unterschiede.

11. Das Natrium zeigt von allen Kationen die größten Schwankungen, die aber nicht mit dem Chlor parallel gehen; infolgedessen sind Natrium und Chlor stets getrennt zu bestimmen.

12. Im Vergleich zum Blut ist der K-Gehalt im Speichel auffallend niedrig, während die Natriumwerte des Speichels zwar die des Kaliums noch übertreffen, aber niemals die Höhe erreichen, die wir im Blute zu finden gewohnt sind.

13. Die Rhodanwerte zeigen besonders starke individuelle Unterschiede. Die gefundenen Mittelwerte überschreiten die bisher in der Literatur angegebenen Werte um ein Beträchtliches. Untersuchungsreihen über den Einfluß des Tabakrauchs auf die Speichelrhodanmenge ergaben, daß der Genuß einer Zigarette den Rhodan-gehalt so gut wie gar nicht ändert, während eine Zigarre sowie geringe perorale Zufuhr von Berhodan den Gehalt des Speichels an Rhodan ganz erheblich steigern vermögen. Eine auffallende Abhängigkeit der Speichelrhodanmenge vom Alter ließ sich nicht feststellen.

14. Die Wasserstoffionenkonzentration des gemischten Speichels ist nicht das Resultat des einfachen Mischungsverhältnisses des sauren Parotis- und alkalischen Sublingualis + Submaxillaris-Speichels.

15. Der Eiweißgehalt des Speichels ist für die Änderung der Speichelreaktion von maßgebender Bedeutung, d. h. bei niedrigen Gesamt- und Reststickstoffwerten des Speichels ist die Wasserstoffionenkonzentration ebenfalls sehr gering, während in Fällen von stark gesteigertem Muzin- und Eiweißgehalt, z. B. während der Gravidität, die H-Ionenkonzentration ebenfalls erhöht ist.

16. Systematische Untersuchungen der H-Ionenkonzentration des Speichels von 120 Schulkindern ergaben, daß mit zunehmendem Alter bei Kindern zwischen 6 und 15 Jahren die Wasserstoffionenkonzentration ebenfalls steigt.

7. Messungen der Wasserstoffionenkonzentration des Speichels von Kindern verschiedenen Ortschaften zeigten, daß bei den Kindern mit den intakteren besser gepflegten Gebissen die H-Ionenkonzentration um den Neutralpunkt während sie in den anderen Fällen gesteigert war.
8. Die Wasserstoffionenkonzentration des nüchternen Speichels ist meistens normal; dann verliert der Speichel langsam seinen sauren Charakter, um sich nach 24 Stunden nach der letzten Nahrungsaufnahme um den Neutralpunkt zu halten.
9. Für die Viskosität des Ruhespeichels von Kindern zwischen 6 und 15 Jahren wurde ein Mittelwert von 1,9 gefunden.
10. Mit zunehmender Viskosität nimmt auch die Kariesfrequenz zu, so daß Mucin eine unbedingt schädigende Wirkung für das Zahnsystem zugesprochen werden muß.
11. Mit zunehmender Viskosität des Speichels nimmt die Wasserstoffionenkonzentration zu und das Kohlensäurebindungsvermögen ab.
12. Zur besseren Auswertung der gefundenen Analysenwerte wird eine Verteilung nach biometrischen Grundsätzen vorgeschlagen.
13. Die Untersuchung des gemischten Ruhespeichels während der Gravidität ergab eine auffällige Verminderung des Kalziumgehaltes um 50% der physiologischen Werte, mit einer gleichzeitigen Vermehrung des Magnesiums und der Phosphate. Außerdem sind Bikarbonat- und Natriumgehalt ebenfalls herabgesetzt.
14. In 17 Fällen von „diffuser Atrophie“ des Alveolarfortsatzes ist im gemischten Ruhespeichel der Gehalt an Kalium etwas, an Natrium sogar stark erniedrigt. Kalzium und Phosphor sind dagegen um etwa 25%, Magnesium um 40% erniedrigt. Es handelt sich also bei dieser Form der Parodontosen um eine grundlegende Änderung des Elektrolytgehaltes des Speichels.



## Anhang.

Tabelle 1.  $p_H$ -Messungen des „Ruhespeichels“ von 120 Stadtkindern.

6. u. 7. Lebensjahr	8. u. 9. Lebensjahr	10. – 13. Lebensjahr
6,48	6,49	6,38
6,58	6,54	6,38
6,62	6,54	6,44
6,63	6,54	6,44
6,63	6,54	6,44
6,63	6,58	6,48
6,67	6,58	6,49
6,67	6,58	6,54
6,67	6,60	6,54
6,75	6,60	6,54
6,75	6,61	6,58
6,75	6,62	6,58
6,75	6,65	6,58
6,78	6,65	6,60
6,78	6,65	6,60
6,78	6,66	6,64
6,78	6,67	6,64
6,78	6,68	6,64
6,80	6,69	6,67
6,80	6,69	6,67
6,80	6,75	6,69
6,85	6,75	6,69
6,85	6,75	6,69
6,85	6,75	6,69
6,87	6,78	6,73
6,87	6,78	6,73
6,87	6,78	6,73
6,87	6,78	6,75
6,90	6,78	6,75
6,92	6,79	6,75
6,92	6,85	6,77
6,97	6,85	6,77
6,97	6,85	6,77
7,00	6,85	6,77
7,00	6,92	6,81
7,00	6,92	6,81
7,10	6,98	6,85
7,10	6,98	6,90
7,31	7,00	7,00
7,32	7,10	7,11
Mittelwert: $p_H = 6,83$	$p_H = 6,72$	$p_H = 6,66$

Tabelle 2.

Messungen des „Ruhespeichels“ von 105 Kindern verschiedener Ortschaften

Dorf A	Dorf B	Dorf C
6,61	6,44	6,39
6,63	6,48	6,39
6,63	6,54	6,44
6,63	6,54	6,48
6,63	6,54	6,48
6,64	6,54	6,48
6,65	6,55	6,54
6,68	6,57	6,54
6,68	6,57	6,57
6,75	6,57	6,57
6,75	6,57	6,57
6,75	6,60	6,60
6,75	6,60	6,60
6,75	6,68	6,64
6,77	6,68	6,64
6,77	6,68	6,64
6,78	6,68	6,65
6,78	6,74	6,65
6,78	6,74	6,67
6,80	6,75	6,67
6,80	6,78	6,68
6,80	6,78	6,69
6,85	6,78	6,74
6,85	6,78	6,74
6,85	6,78	6,80
6,85	6,80	6,86
6,86	6,80	6,86
6,90	6,85	6,87
6,90	6,85	6,88
6,93	6,90	6,92
6,97	6,97	6,92
6,97	6,98	6,97
6,97	7,00	7,00
7,00	7,00	7,10
7,10	7,12	7,15
Mittelwert: $p_H = 6,76$	$p_H = 6,72$	$p_H = 6,66$

Tabelle 3.

Viskosität	Karies-Index 0—1	Karies-Index 1—2,6
1,1	3mal	3mal
1,2	11 „	5 „
1,3	16 „	7 „
1,4	14 „	15 „
1,5	14 „	6 „
1,6	10 „	8 „
1,7	4 „	3 „
1,8	9 „	4 „
1,9	5 „	4 „
2,0	5 „	5 „
2,1	6 „	2 „
2,2	9 „	1 „
2,3	5 „	1 „
2,4	6 „	2 „
2,5	5 „	1 „
2,6	4 „	— „

Tabelle 3. (Fortsetzung).

Viskosität	Karies-Index 0—1	Karies-Index 1—2,6
2,7	= 1 mal	1 mal
2,8	= 1 „	2 „
2,9	= 2 „	1 „
3,0	= 3 „	1 „
3,1	= 1 „	—
3,2	= 6 „	—
3,3	= —	—
3,4	= 1 „	2 „
3,5	= 1 „	—
3,6	= 3 „	—
3,7	= 2 „	—
3,8	= 2 „	—
3,9	= —	1 „
4,0	= 1 „	—
4,1	= 1 „	—
4,2	= —	—
4,3	= 2 „	1 „
4,4	= 2 „	3 „
4,5	= 2 „	—
4,6	= —	—
4,7	= —	—
4,8	= —	—
4,9	= —	—
5,0	= 3 „	1 „
5,1	= 1 „	—
5,2	= 2 „	—
5,3	= 1 „	1 „
5,5	= 1 „	1 „
5,7	= —	1 „

Tabelle 4. Analysenwerte der Tabelle 9 der Größe nach geordnet in mg%

HCO <sub>3</sub>	p <sub>H</sub>	K	Ca	Mg	Na	Cl	CNS	PO <sub>4</sub>
79,00	6,870	40,820	7,56	0,746	41,860	58,47	14,8	9,5
79,00	6,897	40,820	8,19	0,901	51,635	64,40	20,5	9,5
79,00	6,900	44,850	8,33	0,943	60,725	65,35	20,9	9,5
79,00	6,928	47,770	8,81	0,987	64,515	65,35	27,5	9,5
79,00	6,975	48,810	9,52	1,023	65,550	65,35	27,5	10,5
84,29	6,995	50,170	9,83	1,031	65,550	65,35	27,6	11,5
92,20	7,027	50,700	10,53	1,073	68,425	72,23	27,9	11,5
92,20	7,038	50,830	10,71	1,127	68,425	72,23	29,2	11,5
92,20	7,061	54,925	10,71	1,160	68,880	72,23	29,6	12,5
92,20	7,116	56,610	11,23	1,170	69,460	72,23	29,6	12,5
92,20	7,119	57,525	11,70	1,174	70,380	72,23	30,7	13,5
92,20	7,123	58,045	11,90	1,210	71,185	72,23	32,0	13,5
92,20	7,142	58,045	11,90	1,250	71,645	72,23	32,0	14,5
94,80	7,147	59,080	13,04	1,270	73,830	72,23	32,0	15,5
100,09	7,164	59,085	13,09	1,320	73,830	78,01	32,2	15,5
100,09	7,204	60,905	13,09	1,340	73,945	79,11	32,2	15,5
100,09	7,221	60,640	13,81	1,340	74,520	79,11	32,4	15,5
105,34	7,257	60,645	14,04	1,440	76,590	79,11	34,8	15,5
105,34	7,283	61,230	14,28	1,434	76,590	85,94	36,3	16,5
105,34	7,342	62,205	14,28	1,680	76,590	85,99	37,0	16,5
105,34	7,350	63,700	15,20	1,680	78,200	85,99	37,0	16,5
105,34	7,427	63,700	15,47	1,680	78,200	85,99	41,3	17,5
105,34	7,522	65,260	16,66	1,686	79,350	85,99	47,6	18,5
105,34	7,858	65,200	17,50	2,549	79,350			

Tabelle 5. Gesamtdurchschnitt sämtlicher Altersstufen.

$n = 24$	$M \pm m$	$V$	$\sigma$
HCO <sub>3</sub>	93,17 $\pm$ 2,05	10,7 %	10,05
K	55,90 $\pm$ 1,47	12,9 %	7,209
Ca	12,14 $\pm$ 0,527	21,2 %	2,58
Mg	1,29 $\pm$ 0,022	8,6 %	0,112
Na	69,95 $\pm$ 1,72	12,0 %	8,44
Cl	74,23 $\pm$ 1,63	10,7 %	7,99
CNS	30,90 $\pm$ 0,43	6,8 %	2,097
PO <sub>4</sub>	13,51 $\pm$ 0,61	20,2 %	2,735
p <sub>H</sub>	—	—	—

Tabelle 6. 8.—20. Lebensjahr.

$n = 8$	$M \pm m$	$V$	$\sigma$
HCO <sub>3</sub>	95,15 $\pm$ 2,84	8,45 %	8,05
K	54,23 $\pm$ 3,31	17,40 %	9,46
Ca	10,15 $\pm$ 1,14	31,80 %	3,23
Mg	1,276 $\pm$ 0,009	2,10 %	0,028
Na	70,64 $\pm$ 1,83	7,30 %	5,184
Cl	68,79 $\pm$ 1,72	7,00 %	4,864
CNS	33,21 $\pm$ 2,05	17,50 %	5,822
PO <sub>4</sub>	14,06 $\pm$ 0,83	16,70 %	2,355
p <sub>H</sub>	7,132 $\pm$ 0,005	0,17 %	0,013

Tabelle 7. 20.—40. Lebensjahr.

$n = 10$	$M \pm m$	$V$	$\sigma$
HCO <sub>3</sub>	89,02 $\pm$ 2,87	10,2 %	9,096
K	54,66 $\pm$ 1,66	9,4 %	5,276
Ca	11,80 $\pm$ 0,787	21,1 %	2,497
Mg	1,26 $\pm$ 0,034	8,6 %	0,109
Na	65,65 $\pm$ 3,36	16,2 %	10,67
Cl	76,30 $\pm$ 2,48	9,2 %	7,001
CNS	29,57 $\pm$ 2,16	23,2 %	6,862
PO <sub>4</sub>	12,05 $\pm$ 0,17	19,2 %	2,319
p <sub>H</sub>	7,143 $\pm$ 0,005	0,23 %	0,019

Tabelle 8. 40.—71. Lebensjahr

$n = 6$	$M \pm m$	$V$	$\sigma$
HCO <sub>3</sub>	97,44 $\pm$ 5,2	13,0 %	12,74
K	60,17 $\pm$ 1,33	5,4 %	3,27
Ca	13,96 $\pm$ 1,10	19,5 %	2,718
Mg	1,177 $\pm$ 0,057	1,2 %	0,014
Na	76,26 $\pm$ 1,06	3,4 %	2,604
Cl	83,69 $\pm$ 1,32	3,8 %	3,242
CNS	29,83 $\pm$ 2,55	20,9 %	6,247
PO <sub>4</sub>	15,11 $\pm$ 1,00	16,2 %	2,459
p <sub>H</sub>	7,22 $\pm$ 0,017	0,36 %	0,026



## Literaturverzeichnis.

- Abderhalden, Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden. A. Scheunert: Untersuchungen des Speichels 1923, Abt. 4, Teil 6, H. 1.
- Handbuch der biochemischen Arbeitsmethoden. Friedenthal: Die wichtigsten physikalisch-chemischen Arbeitsmethoden 1910, Bd. 1, S. 510.
- Adloff, Mundflüssigkeit und Immunität. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1919, Nr. 12, S. 50.
- Albu-Neuberg, Physiologie und Pathologie des Mineralstoffwechsels. Berlin 1906. Ref.: Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1908.
- D'Alise, Die Reaktion des Speichels bei experimenteller Azidosis und Alkalosis. Arch. scienze biol. 8, S. 26—34.
- Alpern, Die Rolle einiger Elektrolyte im Innervationsmechanismus des Sekretionsprozesses. 1. Mitteilung: Die Wirkung vegetativer Gifte auf die Tätigkeit und den Elektrolytgehalt des Speichels der Glandula submaxillaris. — 2. Mitteilung: Einfluß und Durchschneidung der Reizung der Nervenleitungen auf die Tätigkeit und elektrolytische Zusammensetzung des Speichels aus der Glandula submaxillaris. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1925, Bd. 223—752. Ref.: Chem. Zentralbl. 1926, 1, S. 709.
- Allaria, Über die Wirkung des Speichels im Anfangsstadium der Verdauung beim Säugling. Jahrb. f. Kinderheilk. Bd. 74, Nr. 3.
- Andresen, Untersuchungen über den Rhodangehalt des Speichels. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1910, Nr. 10, S. 736.
- Über die H-Ionenkonzentration des Speichels. Ergebn. d. ges. Zahnheilk. 1922, Bd. 5/6, S. 1439. Ref.: Chem. Zentralbl. 1926, 1, S. 1439.
- Astasheroski, Reaktion des Parotisspeichels beim gesunden Menschen. Zentralbl. med. 1878, Nr. 15.
- Auerbach, Zeitschr. f. physikal. Chem. 1924, Bd. 110.
- Babkin, Die äußere Sekretion der Verdauungsdrüsen. Berlin 1914, 8, 1—87.
- Bamberger, H., Zur Lehre vom Auswurf. Würzburger med. Zs. 2, 1854, S. 333—34.
- Bang, Ivar, Mikromethoden zur Blutuntersuchung. Verlag Bergmann, München.
- Barillé, Le Dissociation des carbonophosphates de la salive. Dtsch. zahnärztl. Wochenschr. 1911, S. 769.
- Beach, The saliva and tooth decay. Dent. Cosmos 1908, Nr. 5. Ref.: Dtsch. zahnärztl. Wochenschrift 1909, Nr. 31, S. 637.
- Becks, Über die Wasserstoffionenkonzentration des menschlichen Speichels unter besonderer Berücksichtigung der jeweiligen  $\text{CO}_2$ -Verhältnisse innerhalb der Mundhöhle. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1928, Nr. 8.
- v. d. Berg, Tandheelkunde in Verband met andere klinische Wetenschappen en beschouwd van maatschappelijk standpunt. Amsterdam 1919.
- Berg, Die Alkaleszenz des Speichels. Zeitschr. f. physikal. Chem. 64, 67. 1910.
- Bidder u. Schmidt, Die Verdauungssäfte und der Stoffwechsel. Mitau u. Leipzig 1852, 1.
- Biedermann, W., Fermentstudium. 7. Mitteilung: Die organ. Komponente der Diastase. Fermentforschung 4, 359. 1921; Münch. med. Wochenschr. 68, 692. 1921.
- Bittorf u. v. Falkenhausen, Arch. f. exp. Pathol. u. Pharmakol. 1926, Bd. 115, S. 1.
- Blomfield, A. L., u. I. G. Huck, The reaction of the saliva. Bull. of the Johns Hopkins hosp. 1920, Bd. 31, S. 118. Ref.: Dent. Cosmos 1921.
- Blum, Chemisch vorbeugende Zahnheilkunde. Americ. dent. Surgeon Bd. 47, Nr. 1 (Jan. 1921). Ref.: Z. W. 1927, H. 4.
- Bos, Exper. Untersuchungen über Speichelsekret. Diss., Amsterdam 1906.
- Bottazzi u. d'Errico, Physiko-chem. Untersuchungen über das Glykogen. Arch. f. d. Physiol. 115, 1901.
- Bunte-Moral, Anatomie, Physiologie, Biologie. Ergebn. d. ges. Zahnheilk. I. Jahrg., H. 1, S. 1.
- Bunting, Dent. Cosmos 1914, Bd. 56.
- Burmester, Kariesempfindlichkeit und Kalkmangel im Blut. Vierteljahrsschr. f. Zahnheilk. 1921, S. 494.

azoni, I residui solidi della saliva umana ed il chimismo del sangue. *Experimentalversuch* us dem physiol. Laboratorium der Univ. Bologna. *Stomatologia* Bd. 1, Nr. 12, S. 764.

tef.: *Monatsschr. f. Zahnheilk.* 1905, S. 57.

erick, The effect of endocrine development on the teeth. *Dent. Cosmos* 1921, Bd. 63.

acci, Einfluß der Qualität der Reizwirkung auf die physikal. Konstante des Parotisspeichels.

lle variazione fisiologica delle pressione osmotica delle saliva umana in rapporto a quelle el suo potere diastatico. *Arch. di fisiol.* 6.

lants, Ursprung der Schwefelzyansäure im tierischen Organismus. *Bull. acad. med.* Belg. 4, 2, 1918.

u. Lubs, *Journ. of bacteriol.* 1917, Bd. 2.

u. Guy W., u. Kenneth L. Carter, Faktoren, die für die Reaktionsänderungen des menschl. Speichels von Bedeutung sind. *Journ. of biol. chem.* 73, 391—404. *Berkeley-Univ. of California.* Ref.: *Chem. Zentralbl.* v. 14. Sept. 1927, S. 1364.

ord, W. M., u. Grunwald, Ref.: *Chem. Zentralbl.* 1925, 2, S. 1067. Lebenswichtigkeit der Chloride. *Zentralbl. f. Physiol.* Nr. 16. 1908.

ford, Der Niederschlag von phosphor- u. kohlen saurem Kalk in Knochen u. Zonen der Verkalkung. *Dent. Mag.* 1926, Bd. 43, Nr. 2. Ref.: *Z. R.* 1927, Nr. 12.

rdson u. Hymanson, Untersuchungen über den Säuglingsspeichel. *Zeitschr. f. Kinderheilk.* 1923, Bd. 35.

inger, *Chemie der Mundhöhle in Scheffs Handbuch* 1922.

ss, Beobachtungen über die innere Reibung in kolloidalen und nichtkolloidalen Flüssigkeiten. *Biochem. Zeitschr.* 33, S. 222—224. 1911.

chfeld, Observations regarding the action of saliva on cement-fillings. *Verhandl. d. internat. Kongr.* Bd. 1, S. 344.

is-Reymond, *Physiol. d. Menschen u. d. Säugetiere.* Berlin 1908.

ger, Über die Bedeutung der Rhodanverbindungen für den tierischen u. menschl. Organismus. *Dtsch. med. Wochenschr.* 1903, Nr. 29, 515.

Treupel, Untersuchungen über Rhodanverbindungen. *Dtsch. med. Wochenschr.* 1911, Nr. 21; 1901, Nr. 39; 1902, Nr. 14; 1903, Nr. 29.

berger u. Hofmeister, Über Verdauungssäfte u. Verdauung des Pferdes. 1. 2. Speichel u. Speicheldrüsen. *Arch. f. wiss. u. prakt. Tierheilk.* 7, 265 u. 433. 1882.

Scheunert, *Lehrbuch d. vergl. Physiol. d. Haussäugetiere,* Berlin 1910.

er Beitrag zur Frage der Ausscheidung von Salzen durch die Speicheldrüsen. *Arch. f. wiss. Tierheilk.* 22, 79—92. 1896.

Über Mund- und Zahnveränderungen in d. Schwangerschaft. *Diss., Paris* 1908. *Bespr.: Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk.* 1911, Nr. 8, S. 152.

rlin, *Ann. Chem. Pharm. (Liebig)* Bd. 49, H. 2, 1884, S. 317.

ti, Bedeutung des gemischten Speichels in der Physiopathologie der Mundhöhle. *Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk.* 1927, H. 21, S. 930.

berg, Treatment of hyper-viscid saliva. (Die Behandlung der Hyperviskosität des Speichels.) *Americ. dent. Surgeon* Bd. 46, Nr. 6, S. 425—427. 1926.

ri, Bemerkungen über den Parotidenspeichel beim Menschen. *Malys. Jb.* 8, 234. 1876; 195. 1879.

s, The human saliva. *Dent. Cosmos* 1921.

uth hygiene etc. *Dent. Cosmos* 62, 453. 1920; *Ber. Physiol.* 3, 216. 1921.

ysiol. u. pathol. Veränderungen und Zusammensetzung d. menschl. Speichels. *Journ. the americ. dent. Assoc.* 1923, Nr. 1.

eder, Der gemischte Speichel des Menschen. *Z. f. Heilk. (Abt. inn. Med.)* 27, 231. 1906.

obachtungen am gemischten Speichel von Gesunden und Kranken. *Zentralbl. f. inn. Med.* 1905, Nr. 2, S. 41. Ref.: *Österr.-Ung. V. f. Z.* 1908, Nr. 3, S. 553.

er, Beitrag zur Biologie der Schwangerschaft. *Inaug.-Diss., Freiburg i. Br.* 1926.

chmann, *Zeitschr. f. Hals-, Nasen- u. Ohrenheilk.* 1922, Bd. 1.

*Arch. di fisiol.* 1905/06, Bd. 3.

Reaktion der Flüssigkeiten des Organismus untersucht vermittels der elektr. Methode. *oc. Biol.* 58, 865; 59, 185. 1905.

er, Fermentwirkung und Wasserstoffionenkonzentration. *Kolloid-Zeitschr.* 40, 1926, S. 234.

cländer, *Zeitschr. f. physikal. Chem.* 38, 1907.

er, Wirkung d. Mundspeichels auf d. Magensekretion. *Therapie d. Gegenw.* 1909, Nr. 9.

tr, zur Kenntnis der diastatischen Wirkung des menschl. Mundspeichels. Einfluß einiger Medikamente auf die Speicheldiastase. *Arch. f. Verdauungskrankh.* Bd. 16, Nr. 3. Ref.: *ösch. med. Wochenschr.* 1910, Nr. 44, S. 2312.

a Experimentelle Studie der Speichelreaktion. *Journ. of the americ. dent. Assoc.* Bd. 13, Nr. 2, S. 222. 1926. Ref.: *Monatsschr. f. Zahnheilk.* 1926, H. 8, S. 337.

- Garret, Über die Viskosität und den Zusammenhang einer Kolloidlösung. Inaug.-Diss., Leipzig 1903.
- Gies, Allied dent. soc. 1914, Bd. 9.
- Goadbey, The buccal secretions and dental caries. Brit. dent. assoc. 1910. Refer.: Erg. 1912, II, Nr. 1, S. 43.
- Göhring, Über die Beeinflussung der Speichelreaktion durch perorale Medikation. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1924, Nr. 4.
- v. Gorup-Besanez, Lehrbuch der physiol. Chemie 3. Aufl., Braunschweig 1874.
- Gruner, Physiologie des Chlorstoffwechsels und seine Beziehungen zur Wasserausscheidung zur Körpergewichtskurve. Zeitschr. f. klin. Med. Bd. 64, H. 5 u. 6.
- Grünbaum, Über den Einfluß des Widerstandes gegen die Sekretion auf den Prozentsatz an Salzen im Speichel und auf die von der Drüse geleistete Arbeit. Journ. of phys. 2, 1898.
- Grisogani, Der Rhythmus der Parotissekretion beim Menschen und Geschmacks- und Geschmacksempfindungen. Atti R. Accad. dei Lincei, Roma (6), 1, 602—604. Ref.: Chem. Zentr. 1925, 2, 1056.
- Gscheidlen, Rhodannachweis. Malys. Jb. 4, 91. 1874. Über konst. Vorkommen einer Verbindung im Harn der Säugetiere. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 16, 401. 1877.
- Hammerbacher, Quantitative Verhältnisse der org. und anorg. Bestandteile des menschlichen Speichels. Zeitschr. f. physiol. Chem. 5, 1881, 302—308.
- Hammarsten, Lehrbuch der physiol. Chemie 1922, S. 356.
- Hardy, Colloidal solution. Journ. of physiol. 33. 1905.
- Heer, Das Alkalibindungsvermögen des Mundspeichels. Schweiz. Vierteljahrsschr. f. Zahnheilk. 1918, H. 1.
- Heidenhain, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 17, S. 3ff.
- Helmholtz u. v. Piotrowsky, Über Reibung tropfbarer Flüssigkeiten. Wissenschaftl. Abh. 1, 1882.
- Henry et Malloizel, Variations de l'activité diastasique de la salive sous-maxillaire en rapport avec la nature de l'excitant. Cpt. rend. de la soc. de biol. 1902, 54, S. 331.
- Hermann, Die H-Ionenkonzentration im Speichel einiger Haustiere. Arch. d. ges. Physiol. 1924, S. 475.
- Herrenknecht u. Becks, Mundhygiene in Misch. Fortschr. d. Zahnheilk. 1928.
- Hess, Der Strömungswiderstand des Blutes gegenüber kleinen Druckwerten. Arch. f. d. ges. Physiol. 1912, 197—214.
- Gehorcht das Blut dem allgemeinen Strömungsgesetz der Flüssigkeiten? Arch. f. d. ges. Physiol. 162. 1915.
- Ein neuer Apparat zur Bestimmung der Viskosität des Blutes. Münch. med. Wochenschr. 54, Nr. 32. 1907.
- Reibungswiderstand des Blutes und Poiseuillesches Gesetz. Zeitschr. f. klin. Med. 71, H. 1. 1908.
- Heymann-Rosenthal, Untersuchungen zur Prophylaxe und Therapie des Zahneiters. Z. R. 1925, Nr. 17/18.
- Hirschfeld, Untersuchungen über die Beeinflussung des erhöhten Blutdruckes bei Arteriosklerotikern durch Rhodalzid. Zentralbl. f. d. ges. Therap. 1914, H. 11.
- Hoppe-Seyler, Handbuch der physiol.-pathol.-chem. Analyse.
- Howe, Über Speichelanalysen. Dent. Cosmos 1911, Nr. 3. Ref.: Ergebn. d. ges. Zahnheilk. II. Jahrg., 1912, Nr. 7, S. 744.
- Jacobi, Fr., Über die quantitative Zusammensetzung der Asche vom gemischten menschlichen Speichel. Diss., Würzburg 1896, S. 21.
- Jacobowitsch in Bidder u. Schmidt, Die Verdauungssäfte und der Stoffwechsel. München Leipzig 1852, S. 10 u. 11.
- Le saliva. Diss., Dorpat 1848.
- Janssen, Jul., Über den Kalziumgehalt des Speichels und seine Beziehung zur Zahnheilkunde. Diss., Hamburg 1925.
- Jappelli, G., Speichelvarietäten und Einfluß des Reizungsortes auf die physiko-chemischen Eigenschaften des Unterkieferspeichels. Zeitschr. f. Biol. 1908, Bd. 51, S. 42.
- — Einfluß der Frequenz, Intensität und Dauer der elektrischen Reize auf die physiko-chemischen Eigenschaften des Speichels. Zeitschr. f. Biol. 1908, Bd. 51, S. 127.
- A., Einfluß einiger Nichtelektrolyte auf die physiko-chemischen Eigenschaften des Speichels und auf die Speichelsekretion. Zeitschr. f. Biol. Bd. 51, 1908, S. 144.
- Über die physiko-chemischen Bedingungen der Speichelabsonderung. Zeitschr. f. Biol. Bd. 48, S. 398.
- Über einige Hemmungserscheinungen bei der Speichelsekretion. Zeitschr. f. Biol. Bd. 51, S. 511.



elli, G., Ref. von Buente-Moral, Untersuchungen über die Speichelabsonderung. Zeitschr. Biol. 1908, Bd. 33.

in, I., Zur klin. Pathol. des Speichels. Wien. med. Wochenschr. Nr. 15, 16. 1892.

ejeva, Starke faradische Hautreizung als bedingter Erreger der Speicheldrüsenarbeit beiunden. Petersb. med. Wochenschr. 1912, Nr. 7. Ref.: Dtsch. med. Wochenschr. 1912, r. 22, S. 1057.

h, Pharyngitis chronica bei Zahnplattenträgern. Arch. f. Ohren-, Nasen- u. Kehlkopfheilk. d. 108.

er die Rhodanausscheidung im Speichel. Arch. f. Dermatol. u. Syphilis 1904.

bo, Entstehung und Schicksal des Rhodan im Organismus. Magy. orv. Arch. 8, 211. 1907.

rowicz u. Speyer, Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1914, 81.

r in Czerny-Keller, Die Ernährung des Kindes. Leipzig 1906, S. 45.

er, Über den Ammoniakgehalt des Speichels. Inaug.-Diss., Hamburg.

insky, Chemie der Schwefelzyansäure. Arch. f. physiol. Chem. 1852, S. 172.

e, Zustandsform des Serumkalziums und ihre pathologische Bedeutung. Klin. Wochenschr. 127, 6. Jahrg., Nr. 17.

uere Ergebnisse der Kalziumforschung. Asher-Spiro: Ergebn. d. Physiol. XXVI.

he, Beitrag zur Chemie des Mundspeichels. Dtsch. Zahnheilk. Ein Band zu Ehren v. Walkhoff. Verlag Thieme, Leipzig.

gleichende Übersicht der hauptsächlichsten Literatur über Vorkommen, Nachweis und Bedeutung der Rhodanverbindungen im menschl. Körper. Ergebn. d. ges. Zahnheilk. 1912, Jahrg., H. 6, S. 537.

er, Quantitative Eiweißbestimmung mit Hilfe der elektr. Leitfähigkeit. Zeitschr. f. klin. med. Bd. 65, H. 1 u. 2.

hoff, Rec. Trad. Chem. 1923, Bd. 42, S. 186.

u Zuverlässigkeit der Chinhydronelektrode für die Messungen der H-Ionenkonz. in verschiedenen Lösungen. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiol. Chem. 1925, Bd. 144, H. 3/6, 259—327.

der Gebrauch von Farbindikatoren. Springer 1926.

ffke, Zeitschr. f. Stomatol. 1921, Bd. 19, H. 5 u. 6.

z, Zur Frage der Bedeutung der H-Ionenkonzentration sowie des Ammoniakgehalts im Speichel. Österr. Zeitschr. f. Stomatol. 1922.

achtungen über den Zahnstein. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1919, H. 1.

g u. Paul, Die chemische Grundlage der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. Zeitschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh. 1897.

er, Über den Schwefelzyansäuregehalt des Speichels beim Menschen. Zeitschr. f. Biol. 7, 6—24. 1898.

z, Der Einfluß des Speichels auf die Karies d. Zähne. Z. R. 1909, Nr. 49, S. 1752.

e, Lehrbuch der physiol. Chemie S. 2, 1868.

Über den Gasgehalt menschl. Sekrete. 1. Gasgehalt des Parotidenspeichels. Zeitschr. f. Biol. 23, 1887, S. 321.

s Über den Parotisspeichel des Menschen. Malys. Jb. 28, 343. 1898.

rd, Die Wasserstoffionenkonzentration und einige ihrer Anwendungsgebiete in der Medizin. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1925, H. 2, S. 33.

ga, La réaction de la salive etc. Soc. Biol. 86, 912. 1922.

er u. E. Bakes, Journ. Americ. chem. soc. 1922, Bd. 44, S. 1954.

ois, Lehrbuch der Physiol. des Menschen 1909.

Über die Umwandlung des Azetonitrils und seiner Hämologen im Tierexperiment. Arch. exp. Pathol. 1894, 34, S. 247.

ey, Über die Physiologie der Speichelsekretion. Journ. of Physiol. 9, 55.

letcher, Über die Sekretion des Speichels, hauptsächlich über die Sekretion von Salzen. Proc. roy. soc. 45, 16—18. 1888.

ann, Über Tabakrauch und Tabakrauchen. Arch. f. Hyg. 1909, Bd. 68.

enstein, Edith, Über den Ammoniakgehalt des Speichels in Beziehung zur Zahnkaries. ss., Hamburg 1924.

rmann, Ein Apparat zur Bestimmung der Viskosität, besonders derjenigen von Serum und anderen tierischen Flüssigkeiten. Biochem. Zeitschr. 33, 1911, S. 218—221.

Chem. Konstitution und physiol. Wirksamkeit der Säuren. Biochem. Zeitschr. Bd. 15. 3 u. 4, 1909, S. 254.

ann, Erfolg mit Rhodalzid. Arch. f. Zahnheilk. 1911, H. 8.

Vertung der Rhodansalze im menschl. Speichel. Arch. f. Zahnheilk. 1910, Nr. 6, S. 3.

l. Bedeutung des Rhodan im Speichel. Münch. med. Wochenschr. 60, 83. 1913.

inkaries und Rhodanthérapie. Arch. f. Zahnheilk. 1913, H. 5.



- Lohmann, Muzin und seine Beziehung zur Zahnkaries. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1904.
- Lucking, Ref.: Chem. Zentralbl. 1926, 1, S. 3404.
- Ludwig, Lehrbuch der Physiologie 2. Aufl., Bd. 2, S. 338. 1923.
- Luers, Eine neue gebrauchsfertige Apparatur zur elektr. Messung der Wasserstoffionenkonzentration. Biochem. Zeitschr. 1926, Bd. 171.
- Lüscher, Über die Wasserstoffionenkonz. in der menschl. Mundflüssigkeit. Passow-S. Beiträge 1925, Bd. 22, H. 1/2.
- Lukomsky, Über die Bestimmung des Speichel-Index betreffs der Labilität des parodontischen Systems. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1926, H. 13, S. 494.
- u. Gurary, Über den Einfluß vagotroper Substanzen auf die Konzentration der  $\text{OH}^-$ -Ionen im Speichel des Menschen. Zeitschr. f. d. ges. exp. Med. 1925, Bd. 47, S. 285—293.
- Malloizel, Études des Conditions de la sécrétion salivaire de la glande sous-maxillaire. rend. de la soc. de biol. 1902, 54, S. 329.
- La salive psychique de la glande sous-maxillaire. Cpt. rend. de la soc. de biol. 1902, 54, S. 330.
- Mandel u. Steudel, Minimetrische Methoden der Blutuntersuchung. Verl. Walther de Gruyter & Co., Berlin u. Leipzig 1924.
- Mangold, Mundspeichelverdauung und ihre Fortsetzung im Magen und Darm. Dtsch. zahnärztliche Wochenschr. 1911, Nr. 3, S. 41.
- Marshall, The neutralizing power of saliva in its relation to dental caries. Americ. journal of physiol. 1915, 261.
- Americ. journ. of physiol. 40, 1. 1916.
- Mayer, Rôle de la viscosité dans les phénomènes osmotiques. Cpt. rend. de la soc. de biol. 1901, 54, S. 330.
- Über die Menge des Rhodans im menschl. Speichel und Harn bei Gesunden und in verschiedenen Krankheitszuständen. Dtsch. Arch. f. klin. Med. 79, 209. 1904.
- McClelland, The influence of various stimuli upon human saliva. Americ. journ. of physiol. 1923, Bd. 63, S. 233.
- Zahnreinigungsmittel und Speichel. Dent. Cosmos 1924, H. 4. Ref.: Z. R. 1925, Nr. 4, S. 10.
- McKinstry u. Carlson, Speicheluntersuchungen mit besonderer Berücksichtigung zugeführter Säuren. Dent. Cosmos 1924, Nr. 8. Ref.: Z. R. 1925, 36, S. 565.
- Michaelis, Praktikum der physikal. Chemie insbesondere der Kolloidchemie. Verlag Springer Berlin 1926.
- Die Wasserstoffionenkonzentration. Springer 1914 u. 1922.
- u. Pechstein, Die Wirkungsbedingungen der Speicheldiastase. Biochem. Zeitschr. 1926, Bd. 59, S. 77.
- Michel, Der Speichel als natürlicher Schutz gegen Karies. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1901, Bd. 19.
- Zahnverderbnis und Speichelbeschaffenheit. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1905, Bd. 23, S. 10.
- Weitere Untersuchungen über „Der Speichel als natürlicher Schutz gegen Karies“. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1902, H. 12, S. 561.
- Die Mundflüssigkeit und ihr Einfluß auf die in der Mundhöhle ablaufenden pathologischen Vorgänge. Dtsch. Zahnheilk. in Vorträgen, Leipzig 1910.
- Über Schulkinderuntersuchungen und deren Ergebnisse, 1878. Korrespondenzbl. f. d. Zahnärzte 1904.
- Möller, Die Viskosität des menschl. Speichels. Inaug.-Diss. Freiburg i. Br. 1928.
- Beitrag zur Frage der Oxydations- und Reduktionsvorgänge im Organismus, speziell im Speichel und in den Mundhöhlenorganen. Ergebn. d. ges. Zahnheilk. Bd. 6, H. 3/4, S. 10. 1925.
- Moll, Zur Kenntnis des Parotisspeichels bei Säuglingen. Monatsschr. f. Kinderheilk. 1905, Bd. 19, S. 10.
- Morelli, Die Rolle des Speichels in der Pathogenese der Karies. Fogorvosi Szemle 1924, H. 13, S. 198. Ref.: Z. R. 1925, H. 13, S. 198.
- Munk, Schwefelzyanbestimmung im Speichel. Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. 6, S. 620.
- Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1895, 61, S. 620.
- Naeslund, Untersuchung über die Ursachen und das Entstehen des Zahnsteins. Nordiskt Odontologiskt Archiv Nr. 4, 1927.
- Nagel, Handb. d. Physiol. Bd. 2, S. 521. 1907.
- Nasse, Untersuchungen über die ungeformten Fermente. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 11, S. 138ff.
- Neild u. Dunkley, Bedeutung des Speichels für die Übertragung der Tuberkulose. Lancet 1912, Nr. 6, S. 10.
- Nerking, Über Rhodanzid, eine neue Rhodanverbindung. Med. Klinik 1912, Nr. 6, S. 10.
- Zur Frage der Giftigkeit des Rhodans. Dtsch. med. Wochenschr. 1913, Nr. 20, S. 10.

ing, Über Rhodalzid und seine Indikation. Allg. med. Zentr. Z. 1912, 15.

ci, Über das Vorkommen von Sulfozyansäure im Magensaft. Chem. Ber. 28, 1318. 1895.

as u. Dubief, Beitrag zum Studium der Rolle des Rhodankaliums des Speichels, sein antiseptischer Wert. Journ. de Phys. 1912, Nr. 6.

Über die Scheidekraft der Unterkieferdrüse. Arch. f. Physiol. 1888, S. 403.

heimer, Handbuch der Biochemie des Menschen und der Tiere. Berlin-Jena 1908.

ld, Die Welt der vernachlässigten Dimensionen. Einführung in die moderne Kolloidchemie. 1920.

ndzüge der Kolloidchemie. Dresden u. Leipzig 1917.

ther u. Druckes, Handb. f. physik.-chem. Messungen. Leipzig 1910.

u. Wagner, Die innere Reibung von Albuminlösung. Biochem. Zeitschr. 27. 1910.

w, Sur la sécrétion psychique des glandes salivaires. Arch. internat. de Physiol. 1904, S. 121.

Arbeit der Verdauungsdrüsen. Wiesbaden 1898, S. 88.

gebn. d. Phys. Bd. 3, 1.

er, Die Gase des Speichels. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 1.

rill, Verhütung der Zahnkaries und Mundsepsis. Berlin 1913.

ichelsekretion und saure Zahnpasta. Brit. dent. Journ. 1924, H. 20. Ref.: Z. R. Nr. 27.1925.

ssen, Mikromethodik. Verlag Thieme, Leipzig 1925.

te, Ulrich, Quantitative Ammoniakbestimmungen im Mundspeichel. Diss. Freiburg 1922.

u. Strebinger, Über die H-Ionenkonzentration des Speichels. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1922. Bd. 40, S. 306.

alle, Recherches expérimentales sur le mouvement de liquide de nature différente dans les tubes de très petits diamètres. Ann. de Rhin. et Phys. 1844, 36.

lski, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 127, 443. 1909.

er u. Hafner, Untersuchungen über die Konstanz der Speichel- $p_H$ . Dtsch. med. Wochenschrift 1925, Nr. 14. Ref.: Z. R. 1925, Nr. 47, S. 745; Monatsschr. f. Zahnheilk. 1926, S. 37.

orten, Die Behandlung der Stomatitis mercurialis mit Rhodalzid. Dermatol. Zentralbl. 1909, Hrg. 20, Nr. 5.

stone, Speicheluntersuchung. Review, Wien. Vierteljahressfachbl. 1909, Nr. 2, S. 81.

, Über die Beziehungen des NaCl-Gehaltes des Speichels zur Karies. Diss., Hamburg 1925.

d, Dent. Cosmos 1918, Bd. 60.

ar-Berg, Kalziumphysiologie und Kalziumstoffwechsel. Ergebn. d. ges. Zahnheilk. 1913, H. 5.

enberg, Die Schwankungen der Wasserstoffionenkonzentration des Harns. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1926, Bd. 212, H. 3/4.

el-Spiro, Ionenwirkungen und Antagonismus der Ionen. Handbuch der normalen u. patholog. Physiol. I. Band, H. 12, S. 705.

sner, Eine leicht auszuführende quantitative Rhodanbestimmung im Speichel mit Berücksichtigung physiol. und pathol. Zustände. Ergebn. d. ges. Zahnheilk. Bd. 6, H. 3/4, S. 297. 1922.

, Die Pathogenese der Salivation. Berl. klin. Wochenschr. 1908, Nr. 15. Ref.: Dtsch. med. Wochenschr. 1908, Nr. 16, S. 865.

ie Zahnverderbnis und Speichelbeschaffenheit. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1905, Hft 12, S. 705.

salzarmut und Entartung. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1908, H. 1.

a Über einige neuere Arbeiten aus der Eiweißchemie und Physiologie. Med. Klinik 1908, H. 4.

r einige neuere Arbeiten aus dem Gebiete der Physiologie. Med. Klinik 1908, Nr. 31.

z, L'analyse chim. de la salive chez les enfants peut. un moyen prophylactique de la carie dentaire. Verhandl. d. 5. internat. Kongr. Bd. 1, S. 475.

hann, Ist das Poiseuillsche Gesetz für Suspensionen gültig? Arch. f. d. ges. Physiol. 155. 1914.

er, Über die Stellung der Physiologie im Universitätsunterricht. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 1925, 2, S. 1061.

Skwasser gegen zähen Speichel. Odontologia. Ref.: Dtsch. zahnärztl. Ztg. 1909, Nr. 19, S. 11.

l, Beiträge zur Bildung des Zahnsteins und ihrer Verhütung. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1914, S. 113.

owsky, Virchows Arch. f. pathol. Anat. u. Physiol. Bd. 53, 1871, S. 216.

owicz, Zentrum der Submaxillardrüse. Neurol. Zentralbl. Nr. 15. 1908.

ee, Die physikalische Chemie in der inneren Medizin. Verlag Steinkopf, Dresden u. Leipzig 1923.

Die Bedeutung der H-Ionenkonzentration in der Pathologie. Kolloid-Zeitschr. 40, 1926, S. 252.

- Scheunert u. Gottschalk, Beitrag zur Lehre von der Speichelsekretion. Zentralbl. f. J. Nr. 8. 1909.
- u. Trautmann, Studien zur Speichelsekretion. 1. Die Sekretion der Parotis des Menschen. 2. Die Sekretion der Parotis und Mandibularis des Schafes.
- Schibig, Über die Bedeutung der Viskositätsmessung für die Kenntnis der organischen Kolloide. Inaug.-Diss., Zürich 1913.
- Schmidt, Im Lehrbuch der physiol. Chemie. Von Gorup-Besanez. Braunschweig 1913. S. 507 u. 516.
- Schmitz, Zur normalen und pathologischen Physiologie des Mundes. Dtsch. zahnärztl. Wochenschr. 1928, Nr. 1, S. 3.
- Schnitzler, Ein Beitrag zur Ergründung der Ursachen der Zahnkaries. Diss., Freiburg 1912.
- Schönbeck, Speicheluntersuchungen. Dtsch. zahnärztl. Wochenschr. 1912, 25, S. 47.
- Schulz, Fr. N. (Jena), 1. Schleimdrüsen und Schleim. 2. Schleimdrüsen und Speichel. d. Biochemie 1924, Bd. 4.
- Schwarz, Chem. Z. 1924, 2, S. 203.
- Sherrington, Reflexbewegungen und ihr Zusammenhang mit dem Munde. Zahnärztl. Wochenschr. Nr. 4, S. 129. 1911.
- Sierakowski, Ref.: Chem. Z. 1924, 2, S. 71.
- Slotte, Über die innere Reibung einiger Lösungen und die Reibungskonstante des H<sub>2</sub>O bei verschiedenen Temperaturen. Wied. Am. 20. 1883.
- Solera, Untersuchungen über den objektiven Rhodannachweis im Speichel. Malys-Jb. 8, 23.
- Sommer, Die Konkreme der Alveolarpyorrhoe im Lichte der Kolloidchemie. Dtsch. zahnärztl. Wochenschr. 25. 1922. Ref.: Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1922, S. 511.
- Sommerfeld, Zur Kenntnis der Magensekretion nebst einigen Bemerkungen über Speichelsekretion. Arch. f. Kinderheilk. Bd. 49, Nr. 1 u. 2. Ref.: Münch. med. Wochenschr. 1922, Nr. 11, S. 574.
- Sørensen, Compt. Rend. du Trav. du Labor. 1921, Carerburg, Vol. 14.
- Spencer-Payne, Der Speichel in seiner Schutztätigkeit auf die Zähne. Dent. Magazine H. 2. Ref.: Z. R. 1925, Nr. 48, S. 763.
- Starr, Variations in the hydrogen-ion concentration of human mixed saliva. Ref.: Dent. 1924.
- Studies of human mixed saliva I. Journ. of Biol. Chem. 1922, Bd. 54, S. 43 u. 55.
- The hydrogen-ion concentration of the mixed saliva, etc. Americ. Journ. of Psychology 33, S. 394.
- Stilk, M., Experimentelle Untersuchungen über künstlichen Zahnstein. Diss., Hamburg 1849.
- Stockes, On the theories of the internal friction of fluids in motion of elastic solids. Cambridge Phil. Soc. 8. 1849.
- Strauss, Koranyi-Richters Handb. 2, 107. 1908.
- Strebing, Über die aktuelle Reaktion des menschl. Speichels. Diss., Frankfurt 1913.
- Tecklenburg, Über den Muzingehalt des Speichels in Beziehung zur Zahnkaries. Diss., Hamburg 1924.
- Thielmann, Speichel Gesunder und Kranker. Diss., Gießen 1897, S. 14.
- Thorpe u. Rodger, On the relations between the viscosity of liquids and their chemical composition. Phil. Trans. London 185, A. Part 2, 1894.
- Tiedemann u. Gmelin, Die Verdauungen und Versuche. 1, 9. Heidelberg 1831.
- Tigersted, Handbuch der physiol. Methodik. Leipzig 1908.
- Lehrbuch der Physiologie des Menschen. Verlag Hirzel, Leipzig 1911.
- Trauner u. Wischo, Zahnsteinbekämpfung und Mundpflege. Österr. Zeitschr. f. Stomat. 1911, H. 10.
- Trénel, Zeitschr. f. Elektrochemie 1924, Bd. 30.
- Tschopp, Die Rückresorption als allgemeines biologisches Prinzip. Schweiz. med. Wochenschr. 1927, 57. Jahrg., S. 1065.
- Eine Mikromethode zur Bestimmung der Chloride in biologischen Flüssigkeiten und Organen. Mikrochemie Nr. 10/12. 1927.
- Eine Mikromethode zur Bestimmung des Magnesium-Ions in biologischen Flüssigkeiten und Organen. Helvet. chim. Acta Vol. X — Fasciculus Sextus, S. 843.
- Türkheim, Die Ernährung und die physikalische Chemie des Schmelzes. Vierteljahrsheft f. Zahnheilk. 1922, S. 487, H. 4.
- Über den Gehalt des Speichels an Muzin, Ammoniak, Kochsalz und Kalzium. Dtsch. zahnärztl. Wochenschr. f. Zahnheilk. 1926, H. 24, S. 897.
- Die Wasserstoffionenkonz. d. Speichel. Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1925, H. 28.
- Ulrich, Chemische Analyse der von Karies befallenen Zähne und derjenigen bei Alveolarpyorrhoe. Dent. Cosmos Dez. 1925.

- Slyke, Bestimmung der Alkalireserve. Handb. d. biol. Arbeitsmethoden von Abderhalden. Abt. 4, Heft 4, Lief. 194.
- Cullen, Journ. biol. Chem. 30, 289, 347. 1917.
- Stadie, Journ. biol. Chem. 49, 1. 1921.
- Del, Transactions of the Chemical Society 1923, Vol. 123.
- gh, On dental caries. Dent. Cosmos 1910, Nr. 4, S. 420. Ref.: Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1910, Nr. 9, S. 702.
- ther, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. Bd. 38, 1896, S. 420ff.
- ns, Beeinflussung von Speichelalkaleszenz bei Aufnahme von Medikamenten. Diss., Bonn 1922.
- disch, Über das Puffersystem primärer Phosphat-Bikarbonate. Biochem. Zeitschr. Bd. 102. 1920.
- ght, On the physiology and pathology of the saliva. 1842.
- Lehmann, Lehrbuch der physiol. Chemie. Leipzig 1850, S. 19.
- ff, Bestimmung der Ionenkonzentration mit indikatorhaltigen Kolloidschichten. Kolloid-Zeitschr. 1926, Bd. 40, H. 4.
- ebrowski, Zur Frage der sekretorischen Funktion der Parotis beim Menschen. Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. 110, 105. 1905.
- graf, Über den Gehalt des Speichels an Rhodankalium bei Tuberkulösen. Beitr. z. Klin. d. Tuberkul. 1907, Jahrg. 8, Nr. 3. Refer.: Dtsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1908, Nr. 37, S. 407.
- rhodanreaktion des Parotisspeichels bei Ohrenerkrankungen. Zeitschr. f. Ohrenheilk. Bd. 61, Nr. 3/4, S. 280. 1910. Ref.: Dtsch. med. Wochenschr. 1910, Nr. 47, S. 2014.
- tz u. Loewy, Lehrbuch d. Physiol. Leipzig 1909.



VERLAG VON HERMANN MEUSSER IN BERLIN

# Klinische Zahnheilkunde

Ein Lehrbuch

von

**Prof. Dr. Alfred Kantorowicz**

Direktor des Zahnärztlichen Instituts der Universität Bonn,  
Leiter der Schulzahnklinik der Stadt Bonn

Dritte, vermehrte und teilweise neu bearbeitete Auflage. In zwei Bänder

**Erster Band**

Propädeutik. Pathologie und Chirurgie der Mundhöhle.  
Konservierende Zahnheilkunde

701 Seiten mit 603 teils farbigen Abbildungen

Gebunden Preis M. 48.—

Band 2 wird etwa denselben Umfang und Preis wie Band 1 haben und  
soll im Laufe des Frühjahrs 1930 erscheinen

Inhalt: Prothetische Zahnheilkunde, Orthodontie, Grenzgebiete, Anhang

\*

## Aus dem Vorwort zur 3. Auflage:

Die Anregung zur Erweiterung des Inhaltes aber verdanke ich im wesentlichen meinen Herren Kritikern, besonders denen, die mit mir scharf ins Gericht gegangen sind, vor allem der trefflichen Kritik des Herrn Salamon, der mit Recht die unsystematische Auswahl der technischen Abschnitte des Buches verurteilte. Aber ähnliche Lücken wie hier taten sich auch in der konservierenden Zahnheilkunde auf. Die scheinbar willkürliche, jedoch durch pädagogische Rücksichten diktierte Auswahl des Stoffes, über deren Angreifbarkeit sich der Verfasser keinen Augenblick im Zweifel war, ließ sich auf zweierlei Weise beheben: durch Weglassung oder durch Ergänzung. Ich wählte den zweiten Weg: 700 neue Seiten warten des Lesers. Oft hat mich freilich bei der Arbeit die Sorge beschlichen, ob ich nicht ein überlebtes Unternehmen fördere, denn die Zeit für das Ein-Mann-Buch dürfte in der Zahnheilkunde wohl endgültig vorüber sein. Vielleicht aber rechtfertigt die Geschlossenheit der Darstellung und die einheitliche Betrachtungsweise gerade in einem für Studenten bestimmten Buche, das vielfach einführenden Charakter besitzt, in etwas diesen Anachronismus.

## AUS BESPRECHUNGEN DER 1. AUFLAGE

### KANTOROWICZ, KLINISCHE ZAHNHEILKUNDE

#### *Deutsche Monatsschrift für Zahnheilkunde 1924 Heft 20 (Hesse)*

„Schon wieder ein Lehrbuch!“ wird mancher ausrufen, wenn er das Buch in die Hände bekommt. Gewiß, schon wieder ein Lehrbuch! aber wirklich ein **Lehrbuch**! Und mit dieser Feststellung ist über die Daseinsberechtigung dieses vorzüglichen Werkes entschieden. Welch ein Unterschied zwischen einst und jetzt! Wollen wir die Fortschritte in unserem Beruf recht deutlich erkennen, so brauchen wir nur neben dieses Werk die Lehrbücher zu stellen, aus denen wir einstmals unser Wissen schöpften. In zehnjähriger Tätigkeit hat hier der Verfasser den gewaltigen Aufstieg unseres Standes, seine großen Fortschritte und Errungenschaften auf allen Teilgebieten zusammengefaßt. Und damit erhält dieses Werk gerade für die älteren Zahnärzte unschätzbaren Wert; können wir doch mit seiner Hilfe manche schwache Stelle in unseren Kenntnissen befestigen. — So erforderlich es wäre, das ganze hervorragende Werk Abschnitt für Abschnitt durchzusprechen, so unmöglich ist leider die Erfüllung dieses Gedankens bei dem gewaltigen Umfang. Wir müssen uns deshalb auf eine Besprechung beschränken, die das Wesentliche hervorzuheben versucht und Bekanntes nur streift, die aber trotzdem dem üblichen Rahmen einer Kritik überschreiten wird. — Blicken wir auf das Gelesene zurück, so müssen wir dem Verfasser uneingeschränkten Dank für dieses Werk zollen. Welch gewaltige Summe von Mühe und Arbeit in diesem modernen Lehrbuch enthalten ist, kann nur der ermessen, der es selber aufmerksam studiert hat. Die Klarheit der Disposition und das zielbewußte Fortschreiten im Aufbau des Ganzen zeigt, daß ein Mann mit umfassenden Kenntnissen, ein auf der Höhe der Zeit stehender Forscher, sein Bestes hergegeben hat, um seinen Schülern und seinem Stande Ansehen und Nutzen zu bringen. Um diesen hochherzigen Geist zu unterstützen, hat auch der Verleger weder Mühen noch Opfer gescheut, um das Werk äußerlich würdig auszustatten und uns die zahlreichen Abbildungen und Skizzen in formvollendeter Schönheit vor Augen zu führen.

#### *Zahnärztliche Rundschau 1924 Nr. 48 (Treitel)*

**Kantorowicz** — kein Name in der „Klinischen Zahnheilkunde“ ist heute heißer umstritten als der seine. Den begeisterten Anhängern stehen erbittert die Gegner gegenüber. Vieles, was er irgendwo geschrieben oder gesprochen hatte, ist ihm mißdeutet, ist zum Gegenstand heftigster Angriffe gegen ihn gemacht worden. Das vorliegende Werk wird eins vor allem schaffen: Klarheit über alles das, was Kantorowicz wirklich erstrebt oder wirklich bekämpft. Es ist eine lückenlose Darstellung alles dessen, was Kantorowicz bisher auf wissenschaftlichem, praktischem und sozialem Gebiet für die heutige Zahnheilkunde geschaffen hat, und es ist zugleich die vorzüglichste Zusammenstellung der heutigen wissenschaftlichen Zahnheilkunde überhaupt. Das gilt nicht allein für die außerordentlich geschickte Auswahl der Abbildungen, die Kantorowicz von überall daher zusammengetragen hat, wo er sie in markantester Form gefunden, sondern nicht minder für die schematisierten Zeichnungen seiner beiden Mitarbeiter, Dr. Balters und Grünberg. — **Klar, deutlich und plastisch ist die Schreibweise des Verfassers**, ohne jedes schmückende Beiwerk, das den wissenschaftlichen Ernst der Darstellung stören könnte. Und doch versteht er es, den Leser zu fesseln, selbst dann, wenn es sich um die Beschreibung der trockensten Dinge handelt. — Die Kapitel, die heute im Brennpunkt des wissenschaftlichen Interesses der modernen Zahnheilkunde stehen, nehmen in diesem Werke anscheinend mit voller Absicht des Verfassers auf Kosten der Beschreibung der rein praktischen Dinge den breitesten Raum ein. — Die Leistung des bekannten zahnärztlichen Verlages von Hermann Meusser sowohl bezüglich des Druckes und Papiers als auch ganz besonders bezüglich der vorzüglichen Wiedergabe der 685 teils farbigen Abbildungen und nicht zuletzt bezüglich des erstaunlich niedrigen Preises ist das Beste, was ich in der Nachkriegszeit gesehen habe.

VERLAG VON HERMANN MEUSSER / BERLIN

---



VIERTELJAHRSSCHRIFT  
FÜR  
ZAHNHEILKUNDE

BEGRÜNDET VON JULIUS WEISS IN WIEN

45. JAHRGANG

SCHRIFTLEITUNG:

PROF. DR. P. ADLOFF

DIREKTOR DES ZAHNÄRZTLICHEN UNIVERSITÄTS-INSTITUTS  
IN KÖNIGSBERG

---

Die Schriftleitung der z. Z. im 45. Jahrgang stehenden Zeitschrift ist bemüht, jedes einzelne Fach der Zahnheilkunde zu berücksichtigen, um im Laufe eines Jahres „Jedem Etwas“ zu bringen. Wie bisher wird das Illustrationsmaterial in ausgezeichneter Reproduktion eine Hauptzierde der Vierteljahrsschrift bilden.

---

Der Preis für den ganzen Jahrgang einschließlich Frankozusendung beträgt 24 Mark, für das Ausland des höheren Portos wegen 26 Mark. Dieser niedrige Preis ist nur möglich, weil die Verlagsbuchhandlung im Interesse einer weiten Verbreitung auf einen Gewinn bei diesem Unternehmen verzichtet. Ein Probeheft steht den verehrl. Interessenten gern kostenfrei zu Diensten.





# Sammlung Meusser

## Abhandlungen aus dem Gebiete der klinischen Zahnheilkunde

1. *Prof. Dr. F. Williger und Prof. Dr. H. Schröder*, Berlin, Die zahnärztliche Hilfe im Felde. 3. Auflage. Mit 67 Abbildungen im Text. 1916 ..... Vergriffen
2. *Dr. Bruno Möhring*, Berlin, Zur Indikation und Technik der Unterkiefer-Resektionsprothese. Mit 57 Abbildungen im Text. 1915 ..... Vergriffen
3. *Dr. C. Rumpel*, Berlin, Kramponlose Zähne. Mit 21 Abbildungen im Text. 1915 ..... 3.— M.
4. *Prof. Dr. F. Williger*, Berlin, Chirurgische Verbandlehre für Zahnärzte. Die Weichteilverletzungen des Gesichts ..... Vergriffen
5. *H. Bünte und Prof. Dr. Moral*, Die Leitungsanästhesie im Ober- und Unterkiefer. 3. Auflage. Mit 29 teils farbigen Abbildungen. 1920 ..... 4.50 M.
6. *Prof. Dr. E. Feiler*, Der Zahnarzt im Felde. 66 Seiten mit 44 Abbildungen. 1916 ..... 3.— M.
7. *Prof. Dr. A. Kantorowicz*, Die Zukunft der Zahnheilkunde und die zahnärztliche Sanierung des deutschen Volkes. 72 Seiten. 1920 ..... 3.— M.
8. *Prof. Dr. P. Krans*, Über Zahnanomalien bei kongenitaler Lues. 42 Seiten mit 5 Tafeln Abbildungen. 1920 ..... 3.— M.
9. *Dr. Ad. Fenchel*, Amalgame. Untersuchungs-, Verarbeitungs- und Herstellungsmethoden. 84 Seiten mit 83 Abbildungen. 1920 ..... 4.50 M.
10. *Dr. Hammer*, Zahnarzt, Über follikuläre Zahncysten. 32 Seiten mit 24 Abbildungen. 1920 ..... Vergriffen
11. *Prof. Dr. E. Becker*, Die Zahnwurzelcysten. 58 Seiten mit 25 einfarbigen und 2farbigen Abbildungen ..... 4.50 M.
12. *Dr. A. Ehrlicke*, Die Odontoplastik im Lichte der Plantationslehre. 62 Seiten mit 68 Abbildungen. 1920 ..... 5.60 M.
13. *Dr. Johs. Spinner*, Vergleichende Forschungen über Zahnkaries bei Mensch und Pferd. Unter Berücksichtigung der therapeutischen Aussichten. 48 Seiten mit 31 meist farbigen Abbildungen. 1922 ..... 3.— M.
14. *Privatdozent Dr. H. Salamon*, Budapest, Eine Systematik der zahnärztlichen Brückenarbeiten. 68 Seiten mit 50 Abbildungen. 1923 ..... 4.50 M.
15. *Dr. Knoche*, München, Die Behandlung der sogenannten Prognathie. 66 Seiten mit 82 Abbildungen. 1923 ..... 4.50 M.
16. *Dr. S. Lublinski*, Berlin, Die Unterkieferbewegungen und die Herstellung naturgetreuer Artikulation in der Zahnprothetik. 76 Seiten mit 53 Abbildungen. 1924 ..... 4.50 M.
17. *Dr. Lewin*, Leipzig, Die Jacketkrone, ihre Herstellung und praktische Anwendung. 106 Seiten mit 104 Abbildungen. 4. Auflage. 1929 ..... 14.50 M.
18. *Privatdozent Dr. Paul W. Simon*, Berlin, Über den Normbegriff in der Orthodontie. 51 Seiten mit 3 Abbildungen. 1925 ..... 4.50 M.
19. *Prof. Dr. O. Loos*, Frankfurt a. M., Umschau und Ausschau über das zahnärztliche Unterrichtswesen. — *Prof. Dr. A. Kantorowicz*, Bonn, Amerikanische und Deutsche Zahnheilkunde. 61 Seiten. 1929 ..... 4.50 M.
20. *Dr. H. Becks*, San Francisco, Ergebnisse neuerer Speichel-Untersuchungen mit besonderer Berücksichtigung der Gravidität und der Parodontosen. 69 Seiten. 1929 ..... 4.50 M.

Herausgegeben von

Professor Dr. Alfred Kantorowicz, Bonn

# Original Articles

---

## A COMPARISON OF RESORPTION OF THE ROOTS OF DECIDUOUS TEETH WITH THE ABSORPTION OF ROOTS OF THE PERMANENT TEETH OCCURRING AS A RESULT OF INFECTION.\*

---

BY JOHN ALBERT MARSHALL, D.D.S., PH.D.

---

[Read at the meeting of the Pacific Coast Society of Orthodontists, San Francisco, February 20, 1928.]

[From the Laboratories of the George William Hooper Foundation for Medical Research, and the College of Dentistry, University of California.]

Mr. President and Members of the Pacific Coast Society of Orthodontists:

The subject of my paper this afternoon is "A Comparison of Physiological Resorption of the Roots of the Deciduous Teeth, with the Pathological Absorption of the Roots of Permanent Teeth Occurring as a Result of Infection."

Absorption of the roots of the deciduous and of the permanent teeth are processes which may involve either normal anatomy and physiology or morbid anatomy and pathology. In other words, there may be changes in form and structure of a tooth as well as changes in its function. In fact, the term pathological physiology may well be applied to some of the problems which confront us. But, before the pathology is discussed, it is necessary to consider for a moment the physiological processes involved in the shedding of the deciduous teeth.

In the first set of teeth, the roots are hardly formed before resorptive processes begin to make themselves manifest. Commencing under normal conditions at the apices of the central incisors, absorption commences about a year after the roots have been completely formed. The preponderance of data indicate that these degenerations commence at about the middle or latter half of the third year. Although the earlier changes occur slowly the final absorptive processes are greatly speeded up until the fibrous union is severed, and only epithelial apposition remains. It takes about four years before the deciduous central incisors are lost, and the spaces requisite for the permanent teeth are produced. The lateral incisors are attacked a few months after the centrals; then follow the first deciduous molars, commencing at about six years and

---

\* Aided by Grants from the Board of Research, University of California, the American Dental Association, and the Pacific Orthodontic Research Fund.

being completed about ten, the second molars a few months later, and finally the deciduous cuspids. These latter show evidence of resorption at about the eighth year and are lost normally by the twelfth to thirteenth year.

There are, of course, many deviations from this chronological table, the causes of which may be summarized under several heads. First, delayed development of the permanent tooth; second, a non-development of the permanent tooth; third, malposition of the permanent tooth, resulting in its subsequent eruption in some location other than its normal one; fourth, mal-position of the permanent tooth which makes it impossible for it to erupt, and finally, the death of the pulp in the deciduous tooth.

The process of resorption was studied quite extensively by the elder Tomes,<sup>1</sup> and our present knowledge of the subject has not been significantly enlarged since then. He pointed out that if a deciduous incisor is extracted in a child four years of age, there will be found small excavations, erosions, or resorptive areas upon the apex and sides of the tooth. However, it is a not uncommon occurrence to find these areas in relatively remote locations, as for example, upon the *periphery* of roots of first and second deciduous molars. The crown of the succedaneous tooth develops between the roots, but the resorptive areas, although usually found upon the root surface adjacent to the forming tooth, are also demonstrable upon outer aspects of the root.

Beginning in the cementum the loss of tooth structure progresses into dentin and may even attack the enamel. Coincidentally with the loss of cementum, a resorption of the dentin occurs along the walls of the root canal. This portion of the process was evidently not studied by Tomes, for he says, "that part of the dentin which immediately surrounds the pulp in deciduous teeth, appears to have more power of resistance than any other part of the tooth, and thus often persists for a time as a sort of hollow column." I have found in some of my sections<sup>2</sup> that the Howship's lacunæ progress outwardly from the pulpal wall. They progress toward the area where active resorption of both cementum and the outer portion of dentin is occurring. In order that this process proceed normally, the pulp must retain its vitality to the last, and it is a severing of the fine nerve fibers in the pulp which accounts in part for the little twinge of pain experienced by children when the deciduous teeth are extracted.

In addition to the loss of tooth structure, the walls of the alveolus immediately surrounding the roots of the deciduous teeth are resorbed, thereby making adequate space for the larger permanent teeth. The



## ORIGINAL ARTICLES

agencies which have been held responsible for the shedding of deciduous teeth, have been discussed in another place,<sup>3</sup> but suffice it to say that we are yet in the dark as to all of the factors concerned.

The greatest objections raised have been directed at the theories of pressure, for not only in man, but in lower animals, there are many instances where it is very doubtful that pressure of the erupting tooth exerts any influence whatever on the processes of resorption. To what extent, therefore, may be assign mechanical stress produced by orthodontic bands to the process of resorption?

Absorptions of permanent teeth due to both infective and non-infective processes are illustrated in some of the following figures.



FIGURE 1

FIGURE 2

Fig. 1—Resorption of deciduous cuspid and partial resorption permanent lateral incisor.

Fig. 2—Absorption of first bi-cuspid.

In Figure 1, the absorptive process is due to an erupting tooth which was mal-posed; in Figure 2, to an incompletely filled and infected pulp canal. In addition, in the latter case, a very slowly erupting cuspid, probably, was concerned in the process of absorption.

This is quite a different picture from that which we see in a physiologic resorption incident to the normal exfoliation of the deciduous tooth and eruption of its successor. There is another undetermined factor also in cases of malposition of the unerupted teeth; there may be either little absorption or considerable.

A microscopic study of resorbed roots of deciduous teeth was presented before this society a year or so ago. The accompanying figures, Nos. 3, 4 and 5, demonstrate Howship's lacunæ on both sides of the root, that is, progressing from the pulp outwardly and from the cementum inwardly.

The cross section of normal tooth structure and the alveolar wall is shown in Figure 6. Here there is no evidence whatsoever of either of the osteoclastic or cementoclastic action so characteristic in cases of resorption.



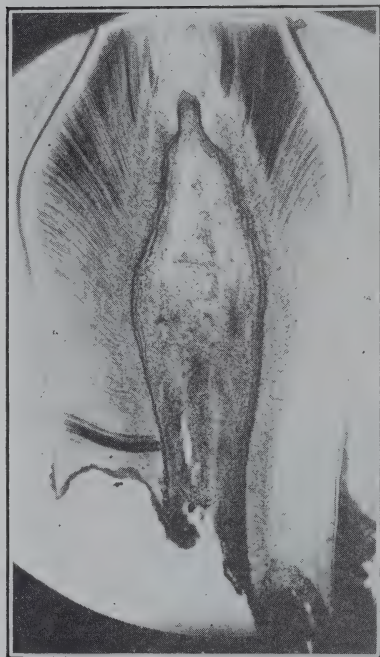


FIGURE 3

Longitudinal ground section of mandibular deciduous central incisor showing resorption of root on pulpal wall and on the peripheral aspect. Note, also, the formation of secondary dentin and the recession of the pulp from the crown aspect to the apex.

lime salts. Lymph is certainly comparatively rich in carbon-dioxid. Applying this hypothesis to the tooth roots, it is quite possible that a

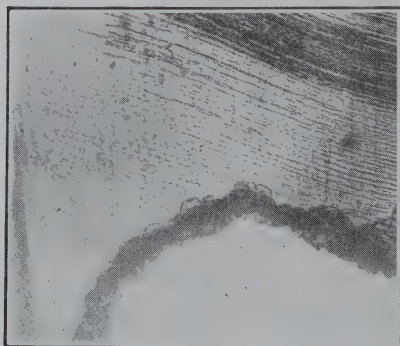


FIGURE 4

High power of lingual aspect of Figure 3.

There are, apparently, three sets of cells taking part in the shedding of deciduous teeth, cells which differ more in their location in the tissue than in their morphology or function. It is probable that the osteoclast starts the process by commencing to open up the alveolar wall. At the same time the cementoclast operating from the peridental membrane, commences to absorb the cementum. At a somewhat later date, the odontoclast, stimulated into action, commences to enlarge the root canal and to produce irregularities therein. These stages I have demonstrated by slides and models.

One can hardly help drawing a comparison between some of the bone changes incident to the loss of deciduous teeth and bone atrophy occurring in the extremities under certain conditions. However, it is to be pointed out that carbon-dioxid has been shown to be a solvent of

venous congestion occurs in and around the maxilla during tooth movement. In fact, I have seen several statements in literature to the effect that an hyperemic mucous membrane is not an uncommon symptom associated with orthodontic treatment. Hyperemia means an increased flow of blood and lymph to the part. Therefore the changes in the blood supply due to these hyperemic conditions may be responsible for the



FIGURE 5

High power of labial aspect of Fig. 3.

breaking down of both tooth and bone structure. Triepel,<sup>4</sup> and others, have shown also that osteoblasts and osteoclasts maintain a balance between anabolism and catabolism of bone.

The latter cells, the osteoclasts, which morphologically are practically indistinguishable from osteoblasts, wander from place to place as they are called upon to render service. If, due to some peculiar irritation, or stress, an accumulation of osteoclasts in one locality occurs, bone resorption may follow. Such a

stress may conceivably be produced in tooth movement.

There are one or two points of interest which have impressed themselves upon me while studying sections of several teeth submitted during the last eighteen months by Dr. Ketcham.

For purposes of discussion we may assume that the loss of deciduous teeth is a physiological process, whereas the erosion or absorption of the apices of permanent teeth, when related to apical infection, is a pathological one. I propose to discuss these two conditions and in a subsequent paper to compare them with the resorption of teeth following orthodontic treatment. I think that when these two processes are clearly differentiated, we will be able to evaluate more fully the possible significance of "orthodontic resorption." (?)

The next set of figures has been made from a lower left deciduous cuspid from a patient of Dr. Ketcham, Donald P., aged 10. The root was almost completely resorbed. I have had prepared a wax model of the tooth which brings out rather strikingly the extent of tooth loss as it is seen in the microscope, and as it is reconstructed by camera lucida drawings. This model gives merely tooth outline and pulp cavity outline, but does not demonstrate the honey-combed structure of the dentin which is seen in the microscope. The point of particular interest is that the process has been going on at a comparatively rapid rate. Apparently every effort has been made to hasten things up and thus get rid of the tooth as soon as possible.



FIGURE 6

The ground cross section of normal tooth near gingival showing dentin, normal cementum, normal periodontal membrane and bone.

The root has been resorbed by two different tissues. First, the periodontal membrane was stimulated to an extent necessary to excite the osteoclasts or the cementoclasts to action. As a result the cementum in the vicinity of the apex was eroded. With the continuation of the impulse responsible for the initiation of the resorptive process, the



FIGURE 7

A portion of the resorbed root from a deciduous cuspid, showing that the reaction is proceeding both from the pulp outwards and from the periodontal membrane inward.



ORIGINAL ARTICLES

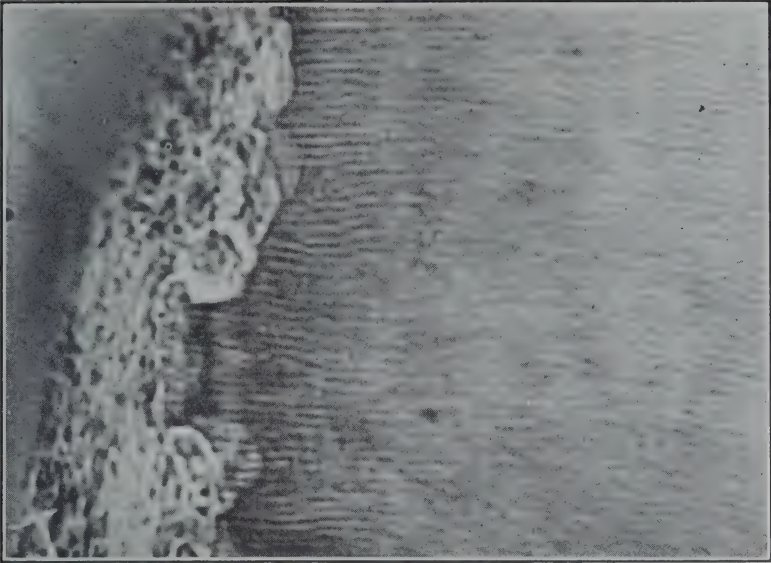


FIGURE 8

Low power showing a portion of the pulp and the pulpal wall of the dentin.  
Note the irregularity and erosion of the walls.

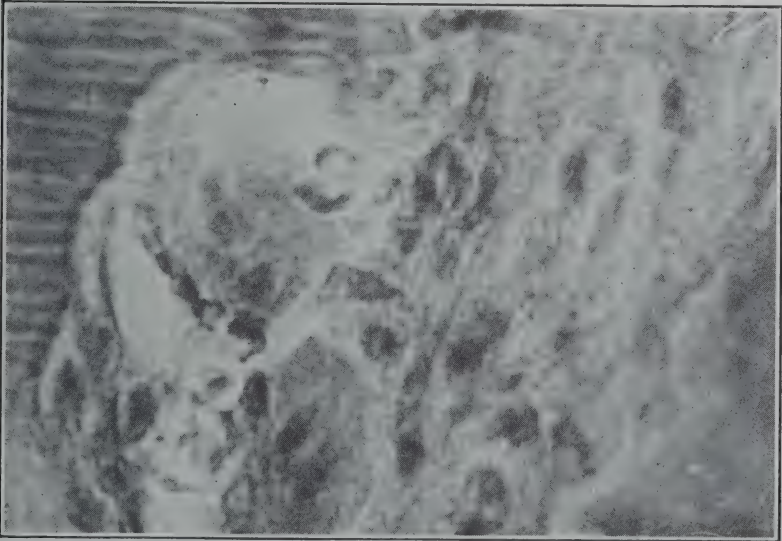


FIGURE 9

High power X1200 showing resorption of dentin on pulpal wall. Howship's  
Lacunae and Odontoclasts are demonstrated.



cementum higher up on the tooth was attacked. Soon the rather thin covering of cementum was penetrated and the peridental membrane

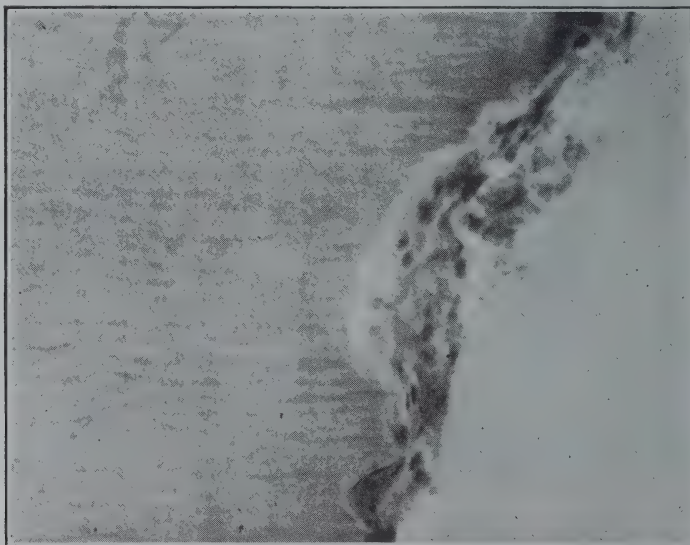


FIGURE 10

Low power showing eroded cementum of deciduous cuspid.

came into contact with dentin. Probably at this point the odontoclasts in the pulp commenced their work so that here we see going on a burrowing similar in some respects to the building of a tunnel. One crew is at one end of the tunnel, the outer layer of the cementum, and the other crew is at the other end of the tunnel, the periphery of pulp canal. The two are working toward each other so that a connection may be established. When this is accomplished the tooth is loose enough to be extracted with the fingers.

As a result of the two processes, the whole root structure is honey-combed with relatively large spaces which communicate between the pulp and the peridental membrane. The Howship's lacunæ are demonstrable in several areas. A comparison of this figure with the ground section gives a clearer idea of this two-fold process.

The next point to be discussed, deals with the pathological apical absorption of permanent teeth. During the last few years I have received from many sources specimens of this type of lesion. Among these are several from Dr. Ketcham. On account of their peculiar interest and the typical microscopic picture which they present, I have prepared several illustrations from them. The first is a specimen from a woman 35 years of age, who gave the following history: She had a severe attack



FIGURE 11

Portion of pulp canal near pulp chamber showing portion of the root canal and the gutta percha filling incorrectly packed in canal.

entirely different from that of the first one. This tooth did not respond favorably to pulp canal treatment. The process is much slower and the cementoclasts and osteoclasts are the only tissue destroyers concerned. The cementum in some areas has been entirely eroded, leaving exposed

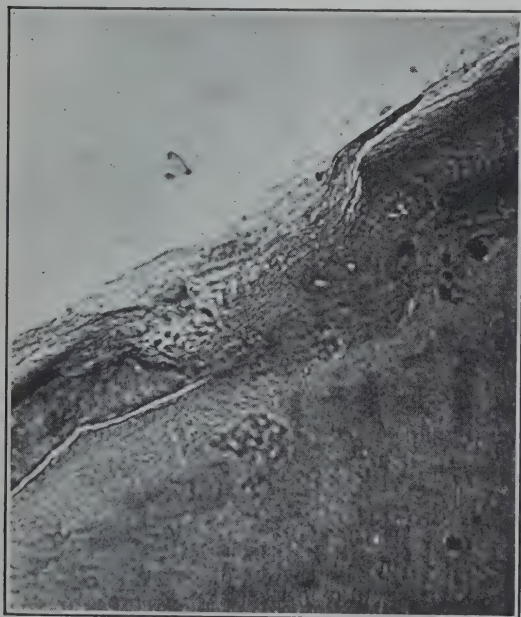


FIGURE 12

Eroded cementum. The pathologic process has just invaded the dentin.

of inflammatory rheumatism at 12 years of age and described a high temperature lasting a month. As a result of the inflammatory rheumatism, she was left in such a crippled condition that she had to learn to walk all over again. This specimen, a bicuspid with an incomplete root canal filling, presents a different picture from that which has just been described.

In this instance another type of stimulus has brought about the activity of the cementoclasts. Following partial necrosis of the pulp, the canal was only half filled.

In such a case, we would not expect to find any activity on the part of the odontoclasts. The wax model presents a picture

entirely different from that of the first one. This tooth did not respond favorably to pulp canal treatment. The process is much slower and the cementoclasts and osteoclasts are the only tissue destroyers concerned. The cementum in some areas has been entirely eroded, leaving exposed dentin in apposition with the pathologic peridental membrane. There are even portions of the root where no cementum is demonstrable and where the peridental membrane has invaded the dentin, producing quite marked irregularities characteristic of absorption.

Finally, may I point out that these models and slides of specimens and of tissue preparations show the outstanding differences between the physiological resorption in the roots of deciduous teeth and the

pathological process occurring at the apices of the infected root canals in permanent teeth. At another time I hope to be able to draw further comparisons which will include studies of teeth extracted during the course of orthodontic treatment.

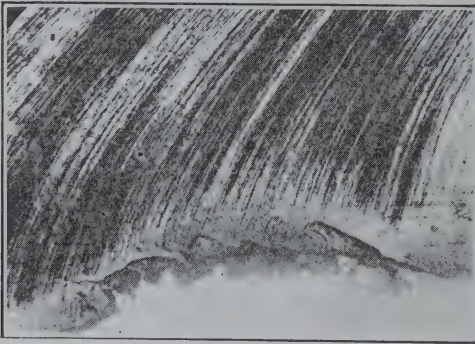


FIGURE 13  
Carious cementum near gingival line. There is no similarity between this process and the eroded areas occurring as result of infection.

This point, I think, should be kept clearly in mind: That partial absorption of permanent roots is not an uncommon process even in mouths where no orthodontic treatment has been conducted. That it occurs in cases of orthodontia is interesting, but that it is not demonstrable in all cases of orthodontic treatment is even more interesting. Let us not be hasty in reaching conclusions nor in forming judgments until all the data are at hand.

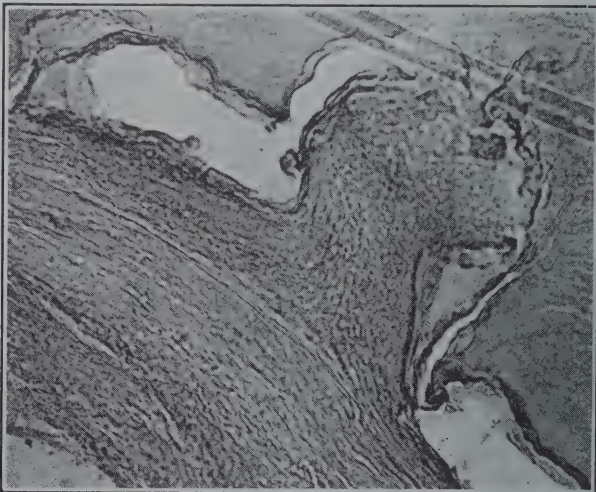


FIGURE 14

Pathologic peridental membrane in apposition with dentin. A portion of the soft tissue has forced its way slowly to such an extent that a semi-spherical depression has been produced.





FIGURE 15

The apical foramen of incompletely filled tooth. A portion of the peridental membrane projects into the foramen.



FIGURE 16

High power showing both walls of the canal.



## THE PACIFIC DENTAL GAZETTE

### BIBLIOGRAPHY.

- <sup>1</sup> Tomes, C. S.: Dental Anatomy, 8th edition, Churchill, London.
  - <sup>2</sup> Marshall, J. A.: Diseases of the Teeth, Their Diagnosis and Treatment. Lea & Febiger, Philadelphia.
  - <sup>3</sup> Marshall, J. A.: "International Journal of Orthodontia, Oral Surgery and Radiography," Vol. XIII, No. 2. Discussion of paper by A. H. Ketchem.
  - <sup>4</sup> Triepel, H.: Arch f. Klin. Chir., 1922, 120, p. 526.
- 

Reprinted from  
THE PACIFIC DENTAL GAZETTE  
October, 1928

Julio Endelman, M.S., D.D.S., F.A.C.D., D.D.Sc., Editor

# JOINT LESIONS PRODUCED IN RABBITS BY THE LACTOBACILLUS

By BEATRICE F. HOWITT  
SAN FRANCISCO, CALIFORNIA

Reprinted from  
THE JOURNAL OF THE AMERICAN DENTAL ASSOCIATION  
Vol. XVI, No. 10, Pages 1923-1925, October, 1929



# JOINT LESIONS PRODUCED IN RABBITS BY THE LACTOBACILLUS\*

---

By BEATRICE F. HOWITT, San Francisco, Calif.

---

WHILE we were working on a quantitative estimation of the mouth flora from a group of men in the state prison at San Quentin, Calif. (Howitt and Fleming, 1928<sup>1</sup>), a number of organisms were isolated belonging to the lactobacillus group of gram-positive aciduric rods. These rods fell into several groups, differentiated by their fermentation reactions in carbohydrate mediums. While we were endeavoring to establish the serologic relationship of these different strains by the production of agglutinins in rabbits, the following observations were recorded: Certain strains were pyogenic when introduced either subcutaneously or intraperitoneally

into rabbits; and when given intravenously, they were capable of producing mucopurulent joint lesions in these animals.

A series of rabbit inoculations were made according to a standardized technique, to determine whether the different types were equally capable of producing lesions. In every case the intraperitoneal inoculation of one massive dose (the centrifugalized sediment of a 24 or a 48 hour culture in 50 c.c. of glucose broth, resuspended in 10 c.c. of the same broth) of each strain into a number of rabbits produced pus-containing nodules in various parts of the peritoneal cavity. The nodules were found at necropsy one week after the inoculation and were generally in the greater omentum or in the intestinal mesenteries, occasionally on the diaphragm, ribs, liver capsule, spleen or the bladder wall, lodged usually in the endings of the small blood vessels. A diffuse purulent infiltration was always found after a subcutaneous injection.

---

\*From the California Stomatological Research group and the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California.

1. Howitt, B. F. and Fleming, W. C.: Quantitative Examination of the Mouth Flora Under Different Dietary Conditions, *J. Dent. Res.*, to be published.



The inoculated organism as identified by fermentation reactions could usually be isolated in pure culture from the different lesions.

When rabbits were given repeated intravenous injections with the same uniform dose (the centrifugalized sediment from a 50 c.c. 24 hour glucose broth culture, resuspended in from 5 to 10 c.c. of glucose broth), the aciduric organisms giving the heaviest growth produced very definite mucopurulent exudates in the joints and occasionally in the adjacent tissues. The lesions were most frequently in the hindleg and the shoulder joints; less frequently in the foreleg or the hip joints. The synovial fluid was greatly increased, thick and mucoid, containing numerous macrophages and polymorphonuclear leukocytes and occasionally a few gram-positive rods. The latter were frequently phagocytosed within the leukocytes. Quite often, the purulent fluid spread along the muscle sheaths, usually visible as a bulky mass extending from the shoulder to the humoral joint. This process was much less frequently observed in the hindleg muscles.

At least two or three rabbits were injected with organisms representing each of the various types, two different methods invariably being employed. Either seven daily doses were given, followed by a rest period of one week before the animal was killed, or three daily doses each week until a total of nine injections had been made, also followed by a week's rest before the rabbit was killed. In each case, the results were about the same for the several strains, showing comparable bacterial plate counts. Those types which gave the heaviest growth in glucose broth and the highest bacterial counts invariably produced marked joint lesions; while those which produced less growth

never gave the purulent synovial fluid. Occasionally a slight mucoid exudate with a few pus cells was present.

An attempt was made to inoculate those strains which were not active growers in glucose broth, in doses corresponding to those given from the more actively growing strains. In a few instances, a definite increase of joint fluid was observed. However, since it was difficult to obtain an equal number of organisms on account of the large amount of material needed, and since the animals usually died from an embolism before the experiment was finished, it was impossible to reproduce the extensive lesions induced by the injection of the active growing strains. The total number of organisms, both living and dead, was probably much greater than could be accurately estimated, thus causing a massive clogging of the capillary beds. Further experiments are contemplated in order to determine definitely whether or not this inability of certain strains to produce purulent joint lesions is an inherent quality of the strain itself or is merely due to a quantitative factor.

After intravenous injections, the organisms were generally recovered from the spleen and the liver, quite often from the kidney and the lungs, rarely from the heart blood. They were also isolated from the spleen and the liver after an intraperitoneal injection, but were never found in the joints, the lungs or the blood stream.

The evidence gathered from these experiments inclines one to the view that the production of joint lesions by such nontoxic organisms of low-grade virulence is largely due in the rabbit to the invasion and clogging of the capillary beds in the regions of poor circulation, as

suggested by Holman (1928)<sup>2</sup> in his review on focal infection, rather than to any particular specific elective localization as suggested by Rosenow and his co-workers (1919)<sup>3</sup> for the streptococcus.

That these aciduric rods are now also added to the list of the organisms producing joint lesions in rabbits seems of significance as the new strains used were all isolated from the oral cavity. Since the lactobacillus group has recently been implicated by several workers (McIntosh, James, and Lazarus-Barlow, 1922<sup>4</sup>; Bunting, Nickerson et al., 1928<sup>5</sup>) as the causative agent in dental caries, the con-

tinual invasion of the blood stream with these organisms from carious teeth may possibly be another source of joint infection in man.

Two known intestinal strains of lactobacilli were also used in this work, one of them being an active grower and the other relatively inactive, corresponding to the other types. The results were the same in the rabbits as those observed with the corresponding oral strains.

Similar lesions were also produced by several strains of the small gram-negative gas-forming mouth organism, *Micrococcus gazogenes* (Hall and Howitt, 1925<sup>6</sup>).

The detailed data and the technical procedures employed in this study will be assembled and reported elsewhere.

2. Holman, W. L.: Focal Infection and "Elective Localization," Arch. Path. & Lab. Med., 5: 68-136 (Jan.) 1928.

3. Rosenow, E. C.: Studies on Elective Localization, J. Dent. Res. 1:205, 1919.

4. McIntosh, J., et al.: Bacterial Origin of Dental Caries, Lancet, 1:1183-1185 (June 17) 1922.

5. Bunting, R. W., et al.: Further Studies of the Relation of Bacillus Acidophilus to Dental Caries, Dent. Cosmos, 70:1-8 (Jan.) 1928.

6. Hall, I. C., and Howitt, Beatrice F.: Bacterial Factors in Pyorrhea Alveolaris. IV, Micrococcus Gazogenes, a Minute Gram-Negative, Nonsporulating Anaerobe Prevalent in Human Saliva, J. Infect. Dis., 37: 112-125 (Aug.) 1925.









A COMPARATIVE STUDY OF THE ACTION OF CERTAIN  
DRUGS AND CHEMICALS ON *BALANTIDIUM COLI*,  
MALMSTEN, IN THE GUINEA PIG.\*

BY

MARION A. SWEENEY.

(Received for publication Dec. 16, 1928.)

Scattered through the literature are numerous and varied treatments for balantidial dysentery. Usually one or two cases have been treated with a substance and from the apparent result is drawn a definite conclusion as to the value of that remedy. Alleviation of the clinical symptoms and discontinuance of the diarrhea appear to be sufficient proof for these authors that the parasite has been completely removed and a cure has been effected. A few negative stool examinations are not reliable for determining a cure, as the balantidia, like most other intestinal parasites, may disappear from the feces for days at a time. Human cases are difficult to follow because a patient, when he begins to improve, is likely to discontinue treatment and pass from observation. These cases, apparently cured, may relapse. Even without therapy cases of seemingly spontaneous cure have been reported, which, when kept under observation, have been known to relapse (Bowman, 1911). Moreover, the fact that one person may report a substance highly efficacious while another may find it absolutely worthless, renders the evaluation of the specific therapeutic activity of that compound very difficult.

A case of severe balantidial dysentery treated with emetine hydrochloride was first reported by Axter-Haberfeld in 1915. He administered 0.03 gm. per day until 0.25 gm. had been given. Rapid improvement and disappearance of the balantidia resulted after the third treatment. The length of time the patient was observed after the final treatment is not stated so the permanence of the effect of the drug is questionable. Tixier (1919) claims to have cured one case of balantidiasis using emetine. Nord (1924) unsuccessfully treated with emetine a case of balantidic colitis. The results of treatment of

From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco, California.

other single cases have been published. Deeks is of the opinion that emetine hydrochloride is directly poisonous to entamoebae and as it is likely that the type of protoplasm of the amoeba and balantidium is similar, a substance which attacks one organism may very readily be toxic to the other. That emetine does not prevent relapse in amoebiasis has been stated by many writers, therefore, it may be presumed that relapse may follow emetine therapy in balantidiasis. However, until the introduction of the pentavalent arsenical stovarsol, emetine has seemed to be the remedy of choice in balantidiasis.

Ortman (1891) observed in hanging drop preparations the action of various chemicals on *Balantidium coli*. From then on the balantidicidal action *in vitro* of drugs and chemicals has been investigated by a number of workers. Walker has indicated that substances which are practically inert *in vitro* may have considerable action *in vivo*. This is most noticeable in the use of certain arsenic compounds in the treatment of trypanosomiasis. Ehrlich and Shiga (1904) found that trypan-red, while wholly inactive *in vitro*, was very efficient in certain trypanosome infections.

Walker (1913) in determining the quantitative balantidicidal action of substances found the salts of mercury and silver to be highly effective. He showed that the compounds of antimony and arsenic, the aniline dyes, ipecac, emetine and quinine, substances which are most successfully used in the treatment of other protozoan infections, possess little if any balantidicidal action *in vitro*.

Later work done *in vitro* by Jameson does not agree with some of Walker's results. Jameson finds quinine, silver and arsenic very feebly toxic while the ipecac group is decidedly toxic for balantidia. The results reported in the present paper, determining the value of substances *in vivo*, will be found to agree and to disagree in part with both the above mentioned authors.

Corbet and Jameson (1927) in their study of the toxicity of phenylarsinic acids for *Balantidium coli* *in vitro* concluded that the arsenic compounds are not particularly toxic for this parasite. They thought that doses which would be fatal to the parasite would be still more toxic for the host. The greatest toxicity for the balantidium was found in sodium o-hydroxy-phenylarsinate and sodium o-amino-phenylarsenate, the latter compound being slightly more effective when correction for hydration was made. These compounds were both completely toxic for *Balantidium coli* in a dilution of 1 : 20,000 with some degree of toxicity noted up to 1 : 50,000. Tryparsamide and stovarsol were toxic in dilutions below 1 : 5,000. Tryparsamide

was lethal at 1 : 500 and stovarsol at 1 : 250. This work was done to determine the relation of chemical structure to toxicity.

In 1928 Jameson reported his work on the action of drugs and chemicals on *Balantidium coli* in cultures. He used the balantidium of the domestic pig, and as we now believe this species to be the same as that of man, their reaction to drugs should be comparable. Eight compounds of ipecacuanha and its alkaloids were tested as representatives of this group. Jameson found ipecacuanha to be very toxic. A dilution of 1 : 50,000 killed all the organisms while inhibition was noted up to 1 : 200,000. Cephaeline acted about the same, being lethal at 1 : 50,000 and completely non-toxic only at 1 : 400,000. From this observation it is concluded that the toxic property of ipecacuanha is due to the cephaeline contained. Emetine was found to be toxic to balantidia at 1 : 10,000 and non-toxic at 1 : 70,000. The toxicity of the other alkaloids varied from dilutions of 1 : 30,000 to less than 1 : 100.

These results are interesting as Walker found the alkaloids practically inert. A similar observation is reviewed by Jameson comparing like discrepancies observed in the cultural work of Dobell and Laidlaw (1926) with the slide experiments of Dale and Dobell (1917) using emetine hydrochloride on *Entamoeba histolytica*.

Kolmer (1926) states that the essential requisite for chemotherapeutic research is the reproduction at will of the disease in less expensive laboratory animals. He says that no systematic chemotherapeutic investigation has been made in balantidial dysentery because of the difficulty of reproducing the disease experimentally. Again Kolmer writes: "I do not believe that it is necessary to reproduce in the experimental animals all of the pathological lesions exhibited in natural infections of human beings . . . but the main requirement is to devise or discover ways and means for producing and maintaining infections in the lower animals with methods for ascertaining the effect or lack of effect of our chemical agent upon the parasite. In the field of protozoan diseases but few attempts of this kind have been made except in malaria."

#### EXPERIMENTAL ANIMALS.

The discovery that guinea pigs are naturally infected with balantidia has opened up a valuable field for the therapeutic study of balantidial dysentery. The guinea pig harbors the parasite in large numbers, but appears to be wholly unaffected by it. I therefore undertook the problem of testing the most favorably reputed dysentery



remedies on *Balantidium coli* in the guinea pig. The majority of the animals used in my experiments were obtained from a stock of very fine, all white guinea pigs which were 100 per cent parasitized with *Balantidium coli*.

Before obtaining this highly infected stock, experiments were performed to determine with what success non-infected pigs could be infected. Ohi (1923) reported his attempts to parasitize rabbits, dogs, monkeys and guinea pigs by inoculating them with the balantidium from cases of human colitis. He was unsuccessful with all of these animals but claims to have infected young domestic pigs. However, other experimenters have successfully infected monkeys. Brumpt (1909) passed the infection from monkey to monkey for six passages and Walker (1913) was able to parasitize 12 of 13 monkeys inoculated.

The general morphology and measurements of the balantidium of the guinea pig conform with those of human and pig source. Guinea pigs were obtained from a stock proved by frequent examination to be free of balantidia. By feeding groups of these animals cysts taken from other guinea pigs, successful infection resulted. We have also been able to parasitize guinea pigs by the rectal injection of trophozoites obtained from the cecum of infected pigs. Balantidia were found in all pigs throughout the entire intestinal tract. The trophozoites being most numerous in the cecum while cysts were observed in the small and large intestines.

#### METHODS.

In the therapeutic experiments the guinea pigs were grouped and treated by various routes over variable periods of time. After a course of treatment the fecal examination of each guinea pig was made to determine if cysts were being passed. A negative finding was not considered conclusive. Usually one animal of a group was chloroformed 24 to 48 hours after the final treatment. If the cecal pouch were negative the entire length of the intestines was carefully examined. Other animals from the same group were killed at various intervals thereafter, to see if the effect of the drug were permanent.

When possible solutions of the substances used were made in sterile distilled water. Insoluble substances were suspended either in oil or water. The mercurials being insoluble in water were dissolved in sterile saline. The dosage of all the remedies was equivalent to the human therapeutic dose reckoned in milligrams per kilogram of body weight. If this amount proved toxic to the guinea pig, less was given.

When a substance was found to be effective, the tolerance of the guinea pig was determined and also the minimum effective dose for cure. The substances giving the most favorable results were usually repeated on other groups of pigs. Treatment was administered by mouth, subcutaneously or intramuscularly and either daily or bi-weekly. The interval of time elapsing between the final treatment and the examination varied from 24 hours to 79 days. The controls were examined simultaneously with and over longer periods than the treated animals. Never was there found a control guinea pig from which the infection spontaneously disappeared.

The results of the treatments are tabulated in percentages (see table). Animals remaining infected after therapy are recorded as percentage positive. When very few organisms were found or degeneration was observed these results were recorded as percentage inhibited. Those animals in which neither cysts nor trophozoites could be found are recorded as percentage negative.

The degree of toxicity of the compounds for the guinea pig is indicated as very toxic, toxic or negative. Considerable individual difference in drug tolerance was noted. Some animals were able to tolerate as many as ten treatments while others showed toxic symptoms after one or two treatments.

#### THERAPEUTIC RESULTS.

In the following experiments the therapeutic action of such drugs and chemicals as have been used in the treatment of balantidial dysentery and other intestinal parasitic infections has been tested on *Balantidium coli* infection in the guinea pig. These substances include the alkaloids of ipecacuanha and quinine, the antihelminthics, certain dyes, compounds of mercury, bismuth and silver, and organic arsenicals.

*Bismuth subnitrate* has been used in the treatment of amoebic dysentery for many years. Alone it was found to be ineffective by most investigators. Dobell and O'Connor (1921) found it valueless in their experience. Deeks (1914) believed it to be efficient when given in heroic doses. Later James and Deeks administered it by mouth along with emetine hypodermically. Greene and Scully (1923) consider diet to be the essential factor and use bismuth only to relieve tenesmus and to check the diarrhea. In my experience bismuth subnitrate has proved to be worthless although it was given in doses equivalent to 1,000 mg. per kg. Intestinal stasis was produced in the guinea pigs. Saline laxatives are usually recommended to be

used with bismuth treatment in human cases. Undoubtedly the action of the remedy would be enhanced by this procedure. Emetine hydrochloride was ineffective in subtoxic doses so it was not combined with the bismuth therapy as has been recommended.

Another bismuthal, *néo-trépol*, which is a bismuth-protein compound containing 96 per cent of bismuth, was used. This also was of no value.

Since *carbon tetrachloride* was introduced by Hall, in 1921, as an antihelminthic considerable study has been made of its properties. It has been found to have an injurious effect on the liver due to accumulation in that organ. The influence of diet in carbon tetrachloride therapy has been considered a valuable adjuvant. The absorption and excretion of the drug have been investigated. Hogue and Van Winkle (1923) reported the effect of carbon tetrachloride on the intestinal protozoa of man and kittens. These workers had found it killed certain protozoa in cultures. In the treatment of giardia and spirochete infections in kittens, the drug was not specific. The results of the treatment of four human cases of flagellate involvement, in some of which amoebae and hookworm were also present, are reported. No permanent effect was obtained in any case. Carbon tetrachloride in treating balantidial infections in guinea pigs gave promising results but was toxic for the majority of the animals.

*Thymol* has been advocated in the treatment of balantidiasis. Behrenroth believed it to be balantidicidal while Lanzenberg was unable to effect a cure. Chatterjee (1928) reports one case in India of apparent cure with thymol by mouth and protargol by rectum. Thymol in balantidial infection of guinea pigs was wholly valueless.

Haughwout and Lantin (1919) used *benzyl benzoate* in the treatment of eight cases of amoebic dysentery with very favorable results. Later Haughwout, Domingo and de Leon (1920) treated one case of balantidiasis from which they believed to have eradicated the parasites. When benzyl benzoate was given to guinea pigs in moderately heavy doses, these authors reported it as non-toxic. I found benzyl benzoate to be very toxic for guinea pigs in doses of 200 mg. per kg. Some animals were unable to tolerate more than one treatment, while others withstood five. All, however, gave evidence of marked intoxication although the therapeutic efficiency in this dosage was 100 per cent. Treatment with 50 mg. per kg. was 80 per cent ineffective and 20 per cent inhibitive. When 10 mg. per kg. were used 100 per cent of the animals remained positive for *Balantidium coli*.

Oxychinolin sulphonic acid combined with 30 per cent iodine and



about 20 per cent sodium bicarbonate, is manufactured by the Behring Institute under the name of *Yatren purissimum*, No. 105. This substance has been advocated as a most efficient amoebicide. Very favorable results have been reported following its use. The most extensive use of the drug was made by Mühlens (1926) who reports excellent results after five years experience in the treatment of amoebic dysentery. Again it is recommended as an adjuvant in emetine treatment. *In vitro* Jameson found it to be only slightly toxic to *Balantidium coli*.

Solutions of yatren must not be sterilized as heating at a high temperature causes the iodine to be split off and toxicity may result. Tolerance to yatren was inconsistent in the guinea pigs. Doses of 1,000 mg. per kg. were toxic for all the animals and inhibition of the infection was 100 per cent. Groups of pigs were able to tolerate four treatments of 100 mg. per kg. while six or more treatments caused poisoning. Fifty mg. per kg., which is equivalent to the human dose, was the maximum tolerated dose for the guinea pigs. The balantidicidal action was not constant as will be seen by referring to the chart.

*Dyes* have been used with some success in certain protozoan infections. Methylene-blue was first introduced as a cure for malarial infections, but subsequently was employed only as an adjuvant to quinine. This dye has been recommended in flagellate infections. Barlow (1915) administered 2 grains three times a day for four days in cases of balantidiasis. A few other dyes have been tried unsuccessfully in this infection. Nisbet (1920) using auratium rectally also failed to obtain a cure.

The administration of ten treatments of methylene-blue to guinea pigs failed to show any balantidicidal action. The further use of other dyes might be of interest.

Reference has already been made to the action *in vitro* and *in vivo* of drugs of the *ipecac* group on *Balantidium coli*. It was found that the effective dose of emetine is so near to the toxic dose that the amount usually given is too small. In this case it would be useless, and if too large an amount is given emetine may be fatal to the host. Young and Tudhope (1920) describe emetine as a protoplasmic poison, acting on the host as well as on the parasite. Severe injury to the heart, kidneys and muscles has been observed. I found emetine hydrochloride toxic to the balantidium only when toxic to the guinea pig.

The powdered root of ipecacuanha is recommended by Brenner-Kiel (1919) to be given by mouth in doses of 1 gram daily for ten or



twelve days. Only 20 per cent of the guinea pigs treated with ipecacuanha became negative.

*Mercury* was tried to see if the results *in vivo* correlated those of Walker *in vitro*. The two compounds tested were not toxic for the protozoan except when toxic for the guinea pig.

Acting upon Walker's suggestion that *silver* might be valuable, three compounds were investigated. Heretofore silver nitrate has been used only as enemata in balantidiasis, some success having apparently been obtained. Silver nitrate was non-toxic for the guinea pig but was equally impotent against the parasite. Silver lactate was more hopeful while argyrol, a silver protein compound, was yet more promising. Continuance of the study of silver might discover some very effective compound.

The great value of *arsenic* in the treatment of diseases has been appreciated in medicine for many years. Its therapeutic value has been tested widely, from amoebiasis to tuberculosis. Chief among the diseases against which arsenic is effective are typanosomiasis and spirochëtiasis. The chemistry of the organic arsenicals in their relation to therapy has been very extensively studied. Arsphenamine, atoxyl, tryparsamide and stovarsol are among the most widely used compounds of arsenic. Salvarsan, in its various forms, was found to cure amoebiasis in luetics who were receiving arsenic injections. Since 1915 arsenic in some form has been experimented with in the treatment of protozoan diseases. More recent investigators favor the combined treatment of emetine.

The curative value of arsenic in balantidial dysentery was first described by Dutcher (1915). Marchoux (1924) in his paper on stovarsol treatment of intestinal parasitism reports significant results in balantidiasis and giardiasis. From the experiments of Walker and of Jameson it appears evident that arsenic is only very slightly toxic for balantidia *in vitro*. Bernard and Bernard (1924) reported two cases of protozoal enterocolitis cured by stovarsol. An excellent field for the study of the treatment of balantidial dysentery is in Guatemala. Aguilar states that during the rainy season of 1925, 10 per cent of the patients admitted to the Quirigua Hospital harbored balantidia. He believes that stovarsol has a specific action in the destruction of the parasite. A diet in which carbohydrate is reduced is advised to supplement the drug. Hermitte and his collaborators apparently obtained good results in cases of balantidiasis giving one tablet of stovarsol a day for three or four days. This is one third to one fourth the usual therapeutic dose.

Cases of poisoning following the use of stovarsol have been reported. Morgan (1926) describes the symptoms of three cases of severe poisoning which occurred when eight patients were given this remedy. The toxicity of the drug was apparent usually after a total dosage of two or three grams. One fatality is also reported in this series.

Stovarsol administered by mouth or subcutaneously to guinea pigs was well tolerated and possessed high balantidicidal action (see table).

Two monkeys suffering from severe dysentery were given stovarsol by mouth. The stool examinations revealed large numbers of active balantidia with other protozoa and metazoa. Encouraging results were obtained although the animals never regained normal health. As further work is to be done using monkeys as the infected hosts, I will report these cases in detail later.

*Tryparsamide* manufactured by Powers-Weightman-Rosengarten Co. was used in my experiments. It is recommended by the manufacturers to be administered intravenously, subcutaneously or intramuscularly in doses not in excess of 50 mg. per kg. of body weight, not oftener than once a week. Caution is given against larger doses and more frequent use. Also it is stated that it should not be given by mouth. However, I obtained better results with tryparsamide given by mouth to guinea pigs than by other routes, and no toxic symptoms were noticed in using it bi-weekly. The consistency of the effectiveness of this drug may be seen by referring to the chart. Again the *in vivo* results contradict those obtained *in vitro*.

Dr. A. J. Ewins of Messrs. May and Baker, Ltd., very kindly sent me generous amounts of the ten arsenicals which Corbet and Jameson used in their *in vitro* tests. I wished to compare my *in vivo* tests of these arsenicals with their *in vitro* findings. Sodium o-hydroxyphenylarsinate and sodium o-aminophenylarsinate, which had highest toxicity for balantidia *in vitro*, were found to be extremely toxic to the guinea pig. When injected in less toxic, although still somewhat toxic amounts, little effect on the parasite resulted. Very few of the animals were able to tolerate a full course of treatments. Atoxyl, which is the sodium salt of p-aminophenylarsinic acid, possessed mainly inhibitive action on the balantidia. When injected in non-toxic dosage it was only 20 per cent lethal to the organism. The balantidia were eradicated from 66.66 per cent of a group of animals treated with sodium p-hydroxyphenylarsinate. When the dose was markedly toxic, 100 per cent cure resulted. Another arsenical, sodium m-aminophenylarsinate, was entirely effective in doses that

*Treatment of Balantidium coli infections in guinea pigs.*

Details of treatment				Results of treatment						
Treatment	No. of guinea pigs treated	Route of administration	Dosage of mg. per kg.	No. of treatments	During days	Examined days after treatment	Percentage positive for balantidia	Percentage parasites inhibited	Percentage negative for balantidia	Toxicity of drug
Bismuth subnitrate.....	6	By mouth	1,000	6	14	17	100	—	—	—
Néo-trépol.....	4	Subcutaneous	5.5	7	21	32-71	100	—	—	—
Carbon tetrachloride.....	6	By mouth	200	1-4	1-4	1-4	33.33	50	16.66	V.T.
"	4	"	50	6	16	1-12	—	25	75	—
"	1	"	50	2	4	3	—	—	100	V.T.
Thymol.....	5	"	5	10	32	12-26	100	—	—	—
Benzyl benzoate.....	5	"	200	1-5	3-10	1-5	—	—	100	V.T.
"	5	"	50	10	11	2-21	80	20	—	—
"	5	"	10	10	32	8-12	100	—	—	—
Yatren.....	2	"	100	6	6	2-5	50	—	50	T.
"	3	"	100	13	18	1-7	—	100	—	T.
"	3	"	50	11	24	1-5	—	—	100	T.
"	4	"	50	6	14	3-39	100	—	—	—
"	3	"	100	4	6	36-48	66.66	33.33	—	—
Methylene-blue.....	5	"	2	10	32	12-25	100	—	—	—
Ipecacuanha.....	5	"	5	6	16	1-12	80	—	20	—
Emetine hydrochloride.....	4	Subcutaneous	2	7	21	19	100	—	—	—
"	5	"	2.5	6	15	3-39	100	—	—	—
"	4	"	5	4	7	3-48	75	—	25	T.
"	5	By mouth	2.5	6	15	3-39	100	—	—	—
"	4	"	5	4	7	1-48	50	—	50	T.
"	3	Subcutaneous	5	4	6	3-51	66.66	—	33.33	T.
"	3	"	10	4	6	1-3	33.33	33.33	33.33	V.T.
Mercury salicylate.....	4	"	20	1	1	2-3	50	—	50	V.T.
"	2	Intramuscular	5	8	29	24	100	—	—	—
"	1	"	5	1	1	1	100	—	—	T.
Mercury benzoate.....	5	Subcutaneous	10	1	1	1-3	80	20	—	V.T.
"	3	Intramuscular	5	8	29	12-25	100	—	—	—
Argyrol.....	4	Subcutaneous	50	10	32	12-13	50	—	50	—
"	6	"	50	8	9	4-22	16.66	16.66	66.66	—

Treatment	No. of guinea pigs treated	Route of administration	Dosage of mg. per kg.	No. of treatments	During days	Examined days after treatment	Percentage positive for balantidia	Percentage parasites inhibited	Percentage negative for balantidia	Toxicity of drug
Silver nitrate.....	5	Subcutaneous	10	4-10	10-32	2-25	100	—	—	—
Arphenamine.....	4	"	20	7	21	19	100	—	—	—
Stovarsol.....	5	By mouth	12.5	6	6	2-26	100	—	100	—
"	5	"	62.5	10	11	1-26	—	—	100	—
"	5	"	13.2	6	15	2-23	—	—	100	—
"	3	"	132	6	15	42	—	—	100	—
"	5	"	200	4	6	3-79	—	—	100	T.
"	5	"	13.2	10	32	12	100	—	—	—
"	5	"	13.2	10	11	2-22	80	—	20	—
"	5	"	20	8-9	8-11	2-12	—	—	100	—
"	4	"	15	5	5	14-17	75	—	25	—
"	5	Subcutaneous	20	10	32	12	60	40	—	—
Tryparsamide.....	4	"	5	7	21	28-42	100	—	—	—
"	6	"	50	10	38	1-5	16.66	33.33	50	—
"	5	By mouth	100	8-9	10	1-17	—	—	100	—
"	5	"	50	6	15	2-23	—	—	100	—
"	5	"	100	4	6	54-55	20	20	60	—
"	3	"	50	9	9	22	—	—	100	—
"	4	"	25	10	11	2-20	—	—	100	—
Sodium o-hydroxyphenylarsinate.....	4	Subcutaneous	50	1	1	2-3	50	50	—	V.T.
"	1	"	50	3	12	4	—	—	100	T.
"	5	"	25	3-6	7-16	1-2	60	20	20	V.T.
Sodium o-aminophenylarsinate.....	4	"	50	1	1	3	—	25	75	V.T.
"	5	"	25	1	1	2-3	60	40	—	V.T.
Sodium p-aminophenylarsinate (atoxyl).....	3	"	50	6	30	8-12	—	66.66	33.33	—
Sodium p-aminophenylarsinate (atoxyl).....	1	"	50	1	1	6	—	100	—	V.T.
Sodium p-aminophenylarsinate (atoxyl).....	1	"	50	2	6	2	100	—	—	T.
Sodium p-aminophenylarsinate (atoxyl).....	5	"	25	6	16	1-12	60	20	20	—





were toxic to the host and 50 per cent effective when in non-toxic doses.

A preparation of tryparsamide received from May and Baker was somewhat more effective, in an equivalent dose, than the P-W-R product but it gave slight indication of toxicity. Toxicity was never observed in using the latter preparation even when repeated doses of 100 mg. per kg. were given. On the other hand, in using many of these arsenicals a decided tonic value has been observed as evidenced by a steady gain in weight by the guinea pigs.

Jameson claimed that troposan, which is sodium 2-hydroxy-5-acetylaminophenylarsinate, was not lethal to balantidia *in vitro* even in a 1 per cent solution. I found troposan to be non-toxic for guinea pigs and 80 per cent balantidicidal. Sodium 3-hydroxy-1-4-benzioxazine-6-arsinate, known as cyclosan, was only 20 per cent effective while parosan, which is the same compound plus an acetylamino group, was 100 per cent effective against the protozoan.

Thus, of the twelve arsenicals employed in attempts to eradicate *Balantidium coli* from the intestinal tract of the guinea pig, eleven gave indications of balantidicidal action. This efficiency varied from 20 to 100 per cent. Arsphenamine alone was found wholly ineffective (see table).

*In vitro* tests may be of value as indicating therapeutic activity in other infections, but in comparing the *in vitro* action of the arsenicals on balantidia with those obtained *in vivo* very little correlation can be found.

Although it is possible to cure balantidiasis in the guinea pig, it should be recognized that the intestinal mucosa of the guinea pig is not seriously injured by the balantidia and there appears to be no penetration of the parasites into the deeper tissues. The question therefore arises as to the action of the same therapeutic agents on balantidial dysentery in man where the intestinal mucosa and deeper tissues are involved.

The application of other dyes, arsenicals and silver compounds might bring forth some interesting leads. Combined therapy would very likely be worthy of trial. The antimonials, which have been used in protozoan and metazoan infections, might possibly be of value. A large and promising field is open for a great deal of interesting work.

#### SUMMARY.

A comparative investigation of the action of drugs and chemicals on *Balantidium coli* infections in the guinea pig has been presented.

The arsenicals were found to be the most effective chemotherapeutic agents. Of these stovarsol, tryparsamide and parosan gave highest balantidicidal action and lowest toxicity to the host.

Certain compounds of silver showed some balantidicidal properties *in vivo*, and other therapeutics gave interesting results.

The lack of correlation between *in vitro* and *in vivo* tests is again demonstrated.

It was found possible to effect a cure of balantidiasis in the guinea pig when the proper therapeutic agent was used.

Suggestions for further research are indicated.

#### Bibliography.

- AGUILAR, R.  
1925. The treatment of *Balantidium coli*. Fourteenth Annual Report of the United Fruit Co., 246-248.
- AXTER-HABERFELD, R.  
1915. Ueber einen Fall von Emetinbehandlung bei Balantidiase. München. med. Wchnschr., 62, 152.
- BARLOW, W.  
1915. Treatment of Hondurian balantidiasis. South. Med. Jour., 8, 937-938.
- BEHRENROTH, E.  
1913. Das *Balantidium coli* und seine pathogene Bedeutung. Arch. f. Verdauungskr., 19, 42-46.
- BERNARD, LEON, AND BERNARD, THOMAS.  
1924. Sur deux cas d'enterocolites à protozoaires guéris par le stovarsol. Bull. Acad. Méd., 91, 800-804.
- BOWMAN, F. B.  
1911. A case of dysentery caused by *Balantidium coli* with coincident filarial infarction of the spleen. Philippine Jour. Sc., 6, 147-152.
- BRENNER-KIEL.  
1919. Ueber Balantidien Enteritis und ihre Behandlung. München. med. Wchnschr., 66, 587-589.
- BRUMPT, E.  
1909. Demonstration du rôle pathogène du *Balantidium coli*; enkystement et conjugaison de cet infusoire. Compt. rend. Soc. de Biol., 67, 103-105.
- CHATTERJEE, B. K.  
1928. A case of balantidial dysentery. Indian Med. Gaz., 63, 79.
- CORBET, A. S., AND JAMESON, A. P.  
1927. The toxicity of phenylarsinic acids for *Balantidium coli*, Malmsten, in cultures, in relation to their chemical constitution. Biochem. Jour., 21, 4, 986-990.
- DALE, H. H., AND DOBELL, C.  
1917. Experiments on the therapeutics of amoebic dysentery. Jour. Pharmacol. and Exper. Therap., 10, 399-459.

DEEKS, W. E.

1914. Dysenteries in the Canal zone, with special reference to amoebic dysentery. *Ann. Trop. Med. and Parasitol.*, 8, 321-355.

DOBELL, C., AND LAIDLAW, P. P.

1926. The action of ipecacuanha alkaloids on *Entamoeba histolytica* and some other entozoic amoebae in culture. *Parasitology*, 18, 206-223.

DOBELL, C., AND O'CONNOR, F. W.

1921. The intestinal protozoa of man.

DUTCHER, B. H.

1915. The failure of emetine hydrochloride, but the apparent success of salvarsan, in a case of balantidiasis. *Am. Jour. Trop. Dis. and Prev. Med.* 2, 663-664.

EHRlich, P., AND SHIGA, K.

1904. Farbentherapeutische Versuche bei Trypanosomenerkrankung. *Berl. klin. Wchnschr.*, 41, 329-332.

GREENE, J. L., AND SCULLY, F. J.

1923. Diet in the treatment of *Balantidium coli* infection. *Jour. Amer. Med. Assn.*, 81, 4, 291-293.

HALL, M.

1921. The use of carbon tetrachloride for the removal of hookworms. *Jour. Amer. Med. Assn.*, 77, 1641.

HAUGHWOUT, F. G., AND LANTIN, P. T.

1919. Protozoologic and clinical studies on the treatment of protozoal dysentery with benzyl benzoate. *Arch. Int. Med.*, 24, 383-397.

HAUGHWOUT, F. G., DOMINGO, E., AND DE LEON, W.

1920. Protozoologic and clinical studies on the treatment of protozoal dysentery with benzyl benzoate. II. Treatment of a case of acute balantidiasis. *Tr. Roy. Soc. Trop. Med. and Hyg.*, 20, 3, 206-212.

HOGUE, M. J., AND VAN WINKLE, C.

1923. The effect of carbon tetrachloride on intestinal protozoa. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 3, 3, 197-201.

JAMES, W. M., AND DEEKS, W. E.

1925. The etiology, symptomatology and treatment of intestinal amoebiasis. *Amer. Jour. Trop. Med.*, 5, 2, 97-136.

JAMESON, A. P.

1928. The action of certain drugs and chemicals on *Balantidium coli* Malmsten, in cultures. *Parasitology*, 20, 1, 66-76.

KOLMER, J. A.

1926. Chemotherapy, pp. 375 and 419.

LANZENBERG, A.

1918. Un cas de balantidiose, autochtone. Son traitement. *Bull. Soc. de path. exot.*, 11, 558-559.

MARCHOUX, E.

1924. Action du stovarsol sur le parasitisme intestinal. *Paris méd.*, 47, 421-426.

MORGAN, JULIA.

1927. Notes on stovarsol poisoning. *China Med. Jour.*, 15, 1086-1090.

MÜHLENS, P.

1926. Five years of treatment of amoebic dysentery with yatren 105. *Rev. Méd. de Yucatan*, 14, 1, 13-14.



NISBET, W. O.

1920. A case of *Balantidium coli* infection. South. Med. Jour., 13, 403-406.

NORD, F.

1924. A case of balantidium colitis treated with emetine. Hygiea, 86, 826-829.

OHI, T.

1923. Investigation of balantidium colitis in Formosa. Jour. Med. Assn. Formosa, No. 229, 19-20.

ORTMAN, K.

1891. Ueber *Balantidium coli*. Berl. klin. Wehnschr., 48, 814-816.

TIXIER, L.

1919. La dysenterie à *Balantidium coli* en France (à propos d'un cas autochtone). Gaz. d. hôp., 42, 1117.

WALKER, E. L.

1913. Quantitative determination of the balantidicidal activity of certain drugs and chemicals as a basis for the treatment of infections with *Balantidium coli*. Philippine Jour. Sc., 8, 1, 1-15.

# CALIFORNIA FISH AND GAME

---

Reprint from CALIFORNIA FISH AND GAME, October, 1929, Vol. 15, No. 4.

## DISEASES OBSERVED IN GAME BIRD RAISING\*

By

H. VAN ROEKEL

(With seven photographs by the author)

---

Game bird raising is becoming more extensive through the increased interests of those who realize and feel that game birds have a commercial and aesthetic value. The operation and management of a game farm is by no means free from discouraging difficulties. Such phases

---

\* Contribution No. 5 from the Game Laboratory, George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco.

as feeding, selection and mating of breeders, hatching, brooding and rearing of chicks, all require a thorough understanding of what is necessary for game birds. In many respects, poultry management may be applied to game bird raising. However, there are certain fundamental important differences that one should not overlook. Experienced game bird breeders should be consulted on these phases.

In establishing a game farm, one often neglects to consider the sanitary aspects which may later cause disease outbreaks. It is less difficult to prevent diseases than to control or eradicate them. One should attempt to provide for ample space, practice a rotation system of pens, and install equipment which can be readily cleaned and disinfected.

Probably one of the greatest sources of disease is brought in through the employment of domestic hens for hatching and brooding. These birds are often selected at random and they may be infested with parasites or other diseases that are transmissible to game birds. Artificial incubation and brooding will do away with this danger to a large extent. Several breeders have found artificial incubation and brooding quite successful, and they feel that it will become the practical method for raising game birds. It will increase the production at less cost. However, one should guard against sacrificing sanitary and hygienic measures for the sake of a large production. For instance overcrowding should be avoided and the rotation of pens should be practiced.

During the past year, several diseases were observed in game birds raised in captivity. More trouble was experienced among the young birds than the mature birds.

#### COCCIDIOSIS

Coccidiosis is an infectious disease caused by a micro-organism which is found in the digestive tract. Investigators have reported this parasite to be present in chickens, geese, ducks, pheasants, grouse, turkeys, quail and other game birds. Different strains of coccidia have been identified among the organisms isolated.

An outbreak among young pheasants was observed at one of the game farms. The disease was first diagnosed in pheasants two and a half weeks old. A mortality of approximately 25 per cent was experienced within eight days. The infected chicks revealed a droopiness, slight diarrhea, loss of appetite and general weakness. These symptoms were observed only a short time prior to death. Autopsy revealed a slight congestion of intestines, contents fluid, and cecal contents dark in color and of dry consistency. Smears from any portion of the intestinal tract would contain coccidia. From the history obtained it was learned that a 35 per cent mortality had occurred in six to eight weeks' old pheasants which had previously occupied the same pens. Later coccidiosis broke out in several pens of fifteen-day-old pheasants. An examination of the birds in general revealed that the infection had disseminated through the entire premises. Since domestic birds were employed for hatching and brooding, it is likely that the infection gained entrance through that source. The hens had been purchased from small poultry flocks in which one often finds disease. Due to lack of space and facilities, isolation methods could not be carried out. After the rearing

season when the pens were vacated, the ground was rested, thoroughly cleaned, plowed and seeded with grain and kale. The pens were rested approximately six months. During the 1929 season the disease has not been observed on this farm. Artificial incubation and brooding will be an aid in combating this disease in game-bird raising.

One duck club reported a heavy loss among young mallard ducks. Laboratory examination revealed a heavy infection with coccidia. An acute inflammation of the eyes existed, together with marked secretion. An accumulation of thin pus was observed in cases where eyelids were glued together.

In one adult quail, coccidiosis was responsible for death. The bird manifested a droopiness, ruffled feathers, drowsiness and general weakness. Death occurred four days after the first symptoms were observed. Post-mortem examination revealed the small intestine and ceca to be distended with gas and food. The liver was slightly congested. Intestinal smear revealed large numbers of coccidia.

#### BLACKHEAD

This disease was observed in wild turkey poults and one adult quail. It is caused by a parasitic micro-organism which may be found in the liver and intestines. According to certain investigators the cecal worm and cecal worm eggs play a role in the transmission of the causative organism. Birds may pick up the infection from the soil, feed and water which has been contaminated by droppings of infected birds.

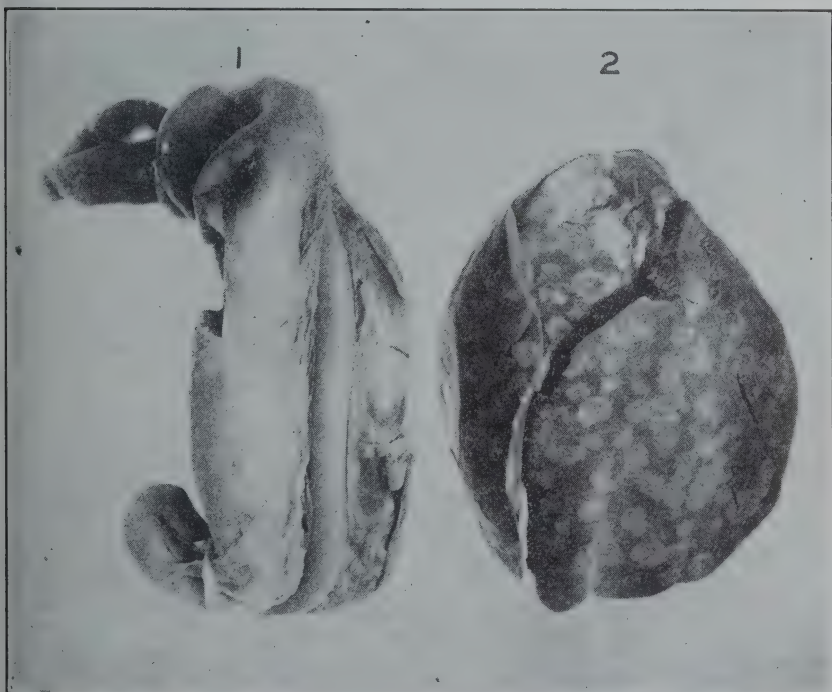


FIG. 90. Blackhead lesions in liver and caeca of wild turkey.  
(1) Enlarged caeca. (2) Liver.



Young birds (four weeks to six months old) are most susceptible. The greatest mortality occurs during this age. A mortality of approximately 10 per cent was experienced in the turkeys. The birds were raised with domestic hens. When eight to ten weeks old, the hen was removed from the pen. No open range or rotation system was practiced to control the disease. The lesions were limited to the intestinal tract and liver. Circumscribed yellowish-gray depressed areas were found on the liver. The walls of the ceca or blind pouches were thickened with lining often necrotic and foul smelling. As yet no successful treatment has been established in the control of blackhead. Artificial hatching and brooding, followed by rearing on clean ground with frequent rotations may prove successful.

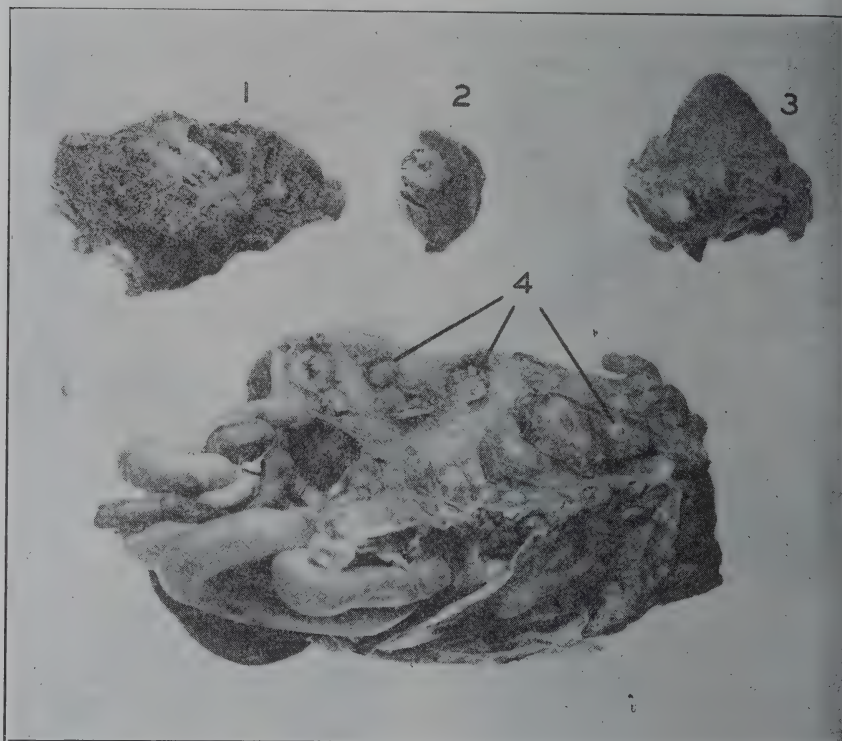


Fig. 91. Internal organs of pintail duck affected with *Aspergillosis*. (1) Lung. (2) Kidney. (3) Heart. (4) Mold colonies on peritoneum of abdominal organs.

#### ASPERGILLOSIS \*

This disease was observed in wild pintail ducks held in captivity. In this case, it was caused by *Aspergillus fumigatus*, commonly known as mold infection. This variety of mold is common in nature, but not all strains are pathogenic. It may be picked up with the feed, water, soil and even from the air. The mortality in this case was rather heavy. In certain birds, death was due to secondary infection with bacteria.

\* The species of *Aspergillus fumigatus* was identified by Charles Thom, mycologist, Bureau of Chemistry and Soils of the United States Department of Agriculture, to whom we feel greatly indebted.

spores of the mold enter the respiratory tract and may pass to the sacs. In heavy infection, the pathological changes are extensive involving the lungs, liver, intestines, kidney, peritoneum and sometimes heart. In most specimens, the lungs were greatly affected. Grayish-

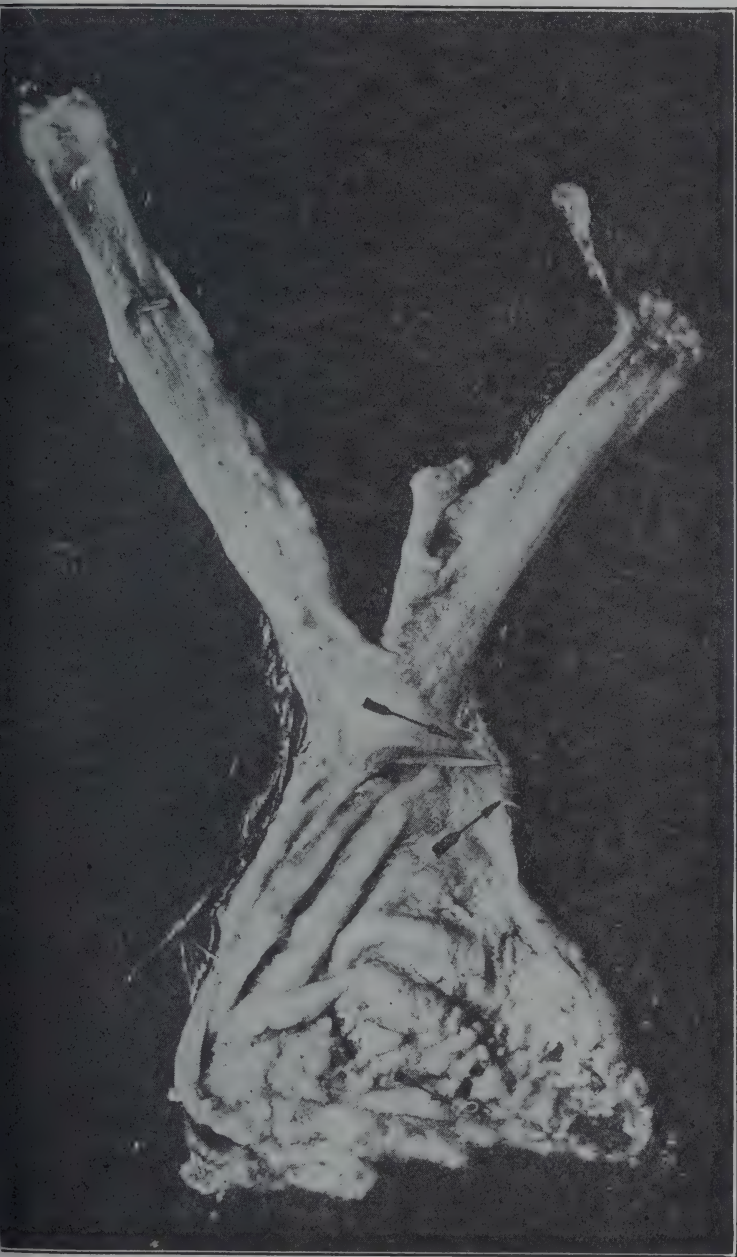


Fig. 92. Crop of California valley quail infested with *Capillaria contortum*. Note thick fibrous lining. Arrows point to worms. Enlarged 1.5 X.

white mold colonies were found on the air-sac walls, in the bronchi and bronchioles and lung tissue. The symptoms manifested were drowsiness, a tendency to sit down, retraction of head and neck, loss of appetite, difficult respiration and general weakness. Death occurred two to three days after first symptoms were observed.

The disease was controlled in a short time after the birds had been moved to a clean pen with uncontaminated feed and water.

*Aspergillosis* was observed in two pintail ducks in nature while investigating duck sickness last fall. Both specimens were generalized cases.



FIG. 93. *Capillaria contortum* removed from the crop lining of California valley quail. Slightly enlarged.

#### NEMATODE INFESTATION\*

A small threadlike worm, *Capillaria contortum*, found interwoven in the lining of the crop may be responsible for mortality in quail. Birds infested with this parasite manifest a general physical disturbance, loss of weight, and general weakness. This parasite when present in large numbers causes great destruction to the mucous lining and underlying structures. A thick, white, rough membrane forms on the crop lining which interferes with the function of the organ. The structure

\* This worm was identified by the Zoological Division, Bureau of Animal Industry, United States Department of Agriculture, to whom we wish to extend our thanks.



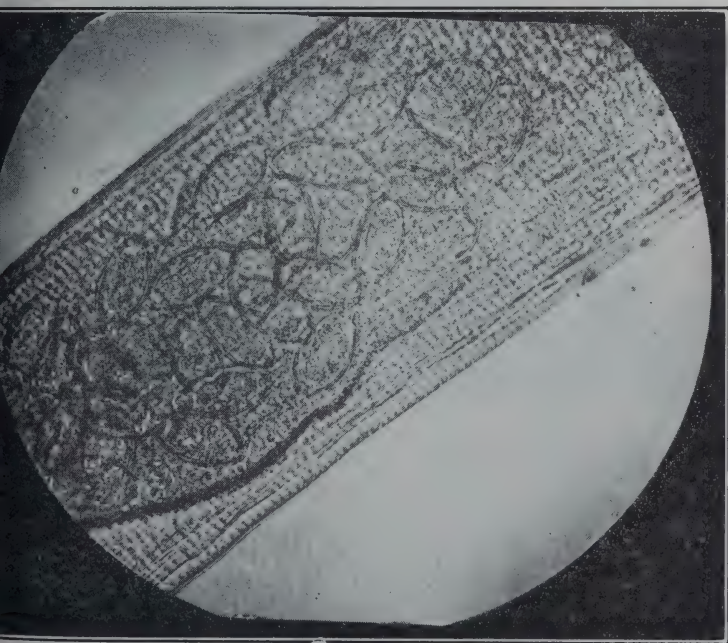


FIG. 94. Portion of cropworm filled with eggs.  
Enlarged 325 X.

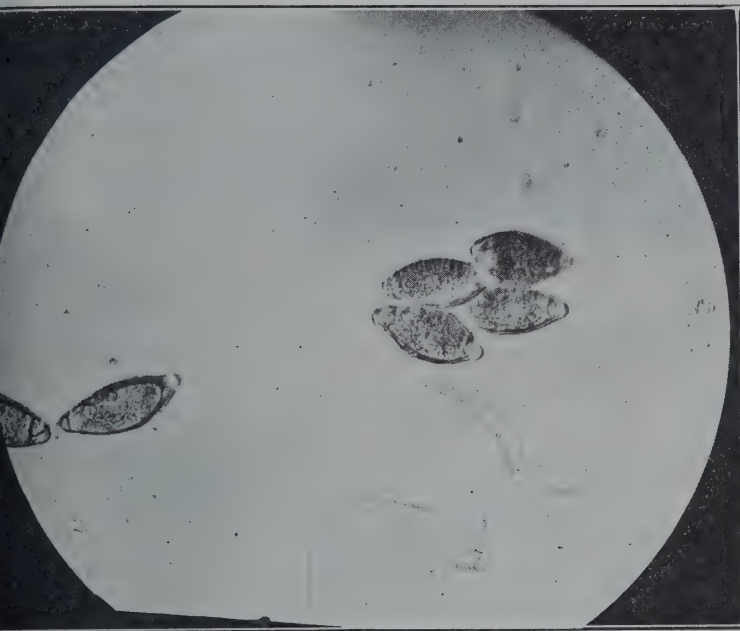


FIG. 95. Eggs of the cropworm (*Capillaria contortum*).  
Enlarged 325 X.



of the mucous lining proper is greatly altered. The worms can be extracted from the lining with a pair of forceps. In heavily infested cases the mucous membrane is almost solidly interwoven with the small threadlike worms. Large numbers of double operculated eggs may be found in the intestinal contents. Little is known about the life history of this parasite. Other capillarids have been reported to be of pathological significance in chickens, turkeys and grouse.

Intestinal round worms and cecal worms are quite common in game birds and may lower their resistance and general health.

#### MISCELLANEOUS

Tuberculosis has been observed in wild turkeys but other birds appear to be less susceptible. One silver pheasant was found infested with air-sac mites. Symptoms were reported as sluggishness, loss of weight and general weakness. No gross lesions were observed and it is doubtful whether the mites were the direct cause of death.

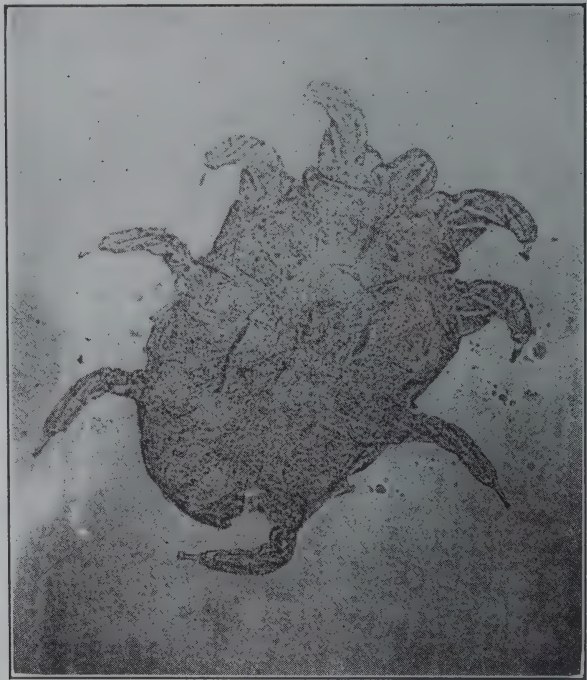


FIG. 96. Air-sac mite (*Cytolcichus nudus*) found in abdominal air-sac of silver pheasant. Ventral view. Enlarged 105 X.

Quail are frequently infested with head lice. Large numbers of eggs may be found attached to head feathers. They may not be the primary cause of disease but may be a predisposing factor.

The prevention, control and treatment of diseases in game birds is similar to that of poultry. In case disease troubles arise specimens should be sent to the laboratory for diagnosis and treatment given according to diagnosis.

REPRINT FROM

# CALIFORNIA FISH AND GAME

"CONSERVATION OF WILD LIFE THROUGH EDUCATION."

Volume 15

SACRAMENTO, JULY, 1929

No. 3

## Acetic Acid as a Control Agent For Cyclochaete and Gyrodactylus in Hatchery Trout

By H. VAN ROEKEL



CALIFORNIA STATE PRINTING OFFICE  
SACRAMENTO, 1929

## ACETIC ACID AS A CONTROL AGENT FOR CYCLOCHAETE AND GYRODACTYLUS IN HATCHERY TROUT<sup>1</sup>

By H. VAN ROEKEL.

During May, 1929, a disease outbreak among steelhead trout (*Salmo gairdneri*) in a hatchery was called to the attention of this laboratory. Upon investigation the following information was obtained.

### HISTORY

The hatchery is supplied with water taken from a near-by stream which in turn, is supplied with water flowing from springs found along its channel. The amount of water received from these sources, however, is very small. Approximately one-half mile above the water intake for the hatchery, the stream also receives water from an electric power plant. This water is not as pure as that from the springs because it travels through a six-mile flume and an open reservoir before it reaches the power plant. A marked difference is observed in the clearness of the stream water above and below the point where the water from the plant enters the stream. Fifteen days prior to the date when the disease was reported, the power plant commenced to shut down during the night and no water would flow into the stream during this time. While the water was shut off at the plant, there would be an insufficient amount flowing through the hatchery. At this time the water became noticeably contaminated with barnacles. This condition may have some relation to the parasitic outbreak in the fish.

### CAUSE OF THE DISEASE

Microscopic examination revealed that the fish were infested with skin parasites, namely: cyclochaete and gyrodaetylus. The former was found on all fish examined while the latter was observed on only a few.

### COURSE OF THE DISEASE

The first sign of the disease, observed by the hatchery foreman, was a slight increase in mortality. The organisms, without doubt, had gained a firm foothold at this time. It is difficult to state when the fish first became infested. A rise of temperature (4 degrees Fahrenheit) occurred when the first mortality was observed. The May temperatures ran fairly constant, with a mean temperature never exceeding 59 degrees. A marked increase in mortality was observed for days after the first evidence of the disease. During a period of five days an approximate loss of 200,000 fish was experienced.

### SYMPTOMS

In general, the fish appeared to be less active and greatly weakened. They inclined to rest near the surface of the water or lie on the floor of the trough. Due to weakness, the current of the water would hold them near the foot end of the trough. The outline of the fins appeared to be ragged which greatly interfered with the function of the fish.

<sup>1</sup> Contribution No. 4 from Fish and Game Laboratories at The George William Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco.

specially the tail fin. A short rapid side motion of the posterior third of the body was observed in fish with injured tail fins. The stronger fish would often attack the weaker ones which would result in a large number of bobtailed fish. Upon close examination with the naked eye, the parasites appeared as white pin-point specks on the fins. In heavily infested cases they were easily detected.

#### LESIONS

Microscopic examination revealed the parasites moving about on the fins and body proper. The organisms could be found on any part of the body, but in light infested cases they were generally confined to the fins. The structure of the fins was greatly injured. The rays appeared to be nude of skin and often broken at the border of the fin. This injury not only affected locomotion, but also resulted in a great loss of blood.

#### TREATMENT

In treating fish infested with parasites one must consider the type of organism to be eradicated, the efficacy of the agent on the parasite, the duration and method of application, after effects on the fish and the cost of the agent. To obtain this information in an expedient manner, it is best to first treat a small number of fish. The strength of the agent and duration of the treatment are dependent upon the type of parasite and the size and condition of the fish. It is known that *Protractylus* can be eliminated with a weak solution of acetic acid. Since no specific treatment for cyclochaete was known, several agents were considered. Acetic acid solution was first employed. It was observed that cyclochaete can be eliminated from two months old trout bathed in a .15 per cent solution of glacial acetic acid for one minute. This strength of the solution and duration of the treatment did not produce any serious after effects on the fish. With a net the fish were immersed into a tub containing the acetic acid solution. Approximately 4000 fish could be treated at one time. A deep net as used in hatchery practice for transferring fish was employed. Every precaution was taken to keep the fish in constant contact with the acid solution for the required time. The upper portion of the net was also disinfected by dipping it frequently into the solution. If care is exercised few fish escape from the net. At the end of 45 to 60 seconds some of the fish will commence to show signs of distress and turn over on their side. The duration of the treatment should not exceed one minute in the size treated as it would result in a heavy loss. The loss is dependent upon the condition of the diseased fish.

After the acetic acid bath the fish were placed in troughs which had been cleaned and disinfected with a 2½ per cent solution of formalin. The fish should be placed in the trough near the water flow where conditions are most suitable. A large number of fish will fall to the floor of the trough and appear as dead, but within 20 to 30 seconds all will have recovered and appear normal. A slight increase in mortality was observed for some hours after the treatment. The dead fish were the weaker infested ones which could not survive in spite of any treatment. The mortality dropped down to normal about forty-eight hours after the treatment. The general condition of the



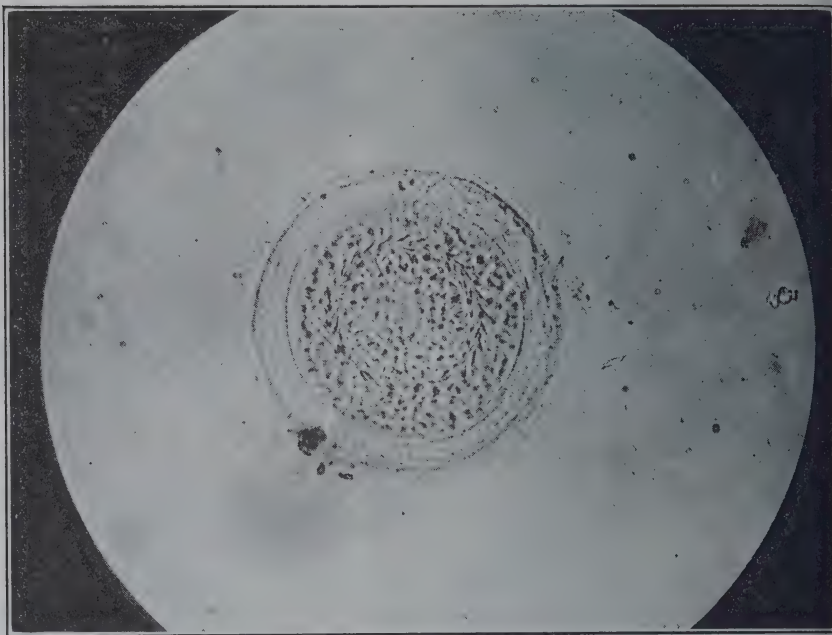


FIG. 78. Cyclochaetae. Skin and gill parasite isolated from two months' old steelhead trout. Enlarged 325 times.

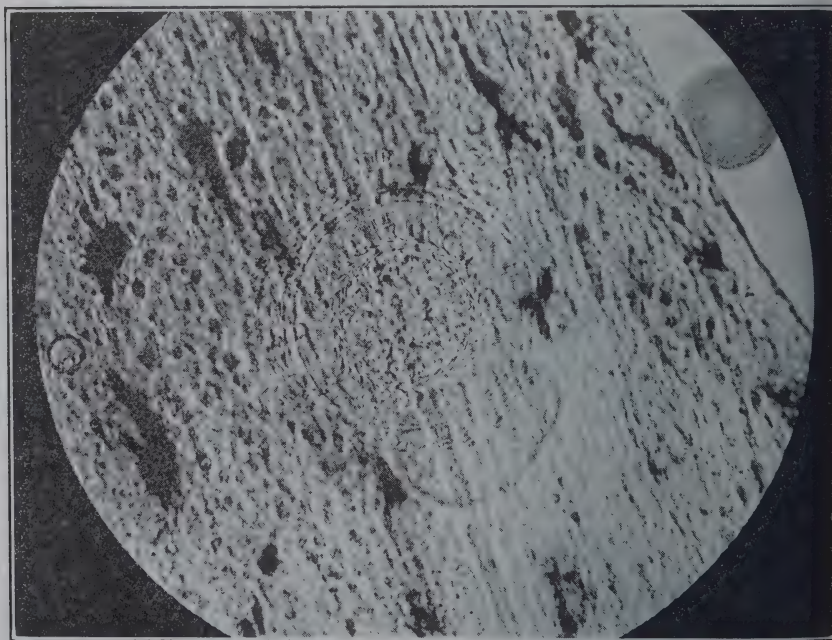


FIG. 79. Cyclochaetae attached to tail-fin of two months' old steelhead trout. Enlarged 325 times.

h improved rapidly. Frequent microscopic examination of dead and live fish revealed no cyclochaete. The treatment did not eliminate the gyrodaetylus completely, as this parasite was found on two different specimens of all the treated fish examined. Further treatment would be necessary to eliminate this organism completely.

Among other agents employed it was observed that a .25 per cent formalin solution would kill both cyclochaete and gyrodaetylus within five minutes. The net treatment was employed as with the acetic acid. Formalin, however, appeared to be slightly more toxic to small fish.

Methylene blue<sup>2</sup> (1-1000 of a saturated solution) did not kill the organism at the end of one hour. Experiments with lower dilutions were not attempted because the agent would be more expensive for general treatment than acetic acid or formalin solutions. Fish remained alive for at least twenty-four hours in a 1-1000 methylene blue solution without being affected.

Acriflavine was also used in a very dilute solution (1-750,000). This agent can not be recommended because it did not kill the organism and proved injurious to the fish. The organisms were alive after five minutes exposure to the solution.

The action of the acetic acid on the organism is not definitely known. Acetic acid belongs to the group of simple acids which act as an external irritant.

#### SUMMARY

The acetic acid solution was found to be effective in the control of cyclochaete and gyrodaetylus and the least toxic to fish. Formalin, though slightly toxic, can also be recommended in the control of these parasites. Methylene blue and acriflavine can not be recommended because the cost of treatment would be far greater than that of acetic acid or formalin if stronger solutions were employed.

All instruments and troughs can be readily disinfected with 2½ per cent formalin solution which has proved to be effective.

The strength of the disinfecting agent depends upon the condition and size of the fish and the organism which is to be eradicated.

Other agents such as dilute sulphuric acid, chloride of lime and copper sulphate were not employed which also may prove to be of some merit in eradicating these parasites.

The disinfecting solutions can be prepared by the fish culturist with little difficulty. The acetic acid should be 99 per cent pure and formalin should contain 40 per cent formaldehyde. These agents can be obtained from any chemical company. The dilute solution (.15 per cent) may be prepared according to the following ratio:

One part of acetic acid (99 per cent) + 658 parts of water.

One ounce of acetic acid (99 per cent) + 5 gallons and 18 ounces of water.

76 cubic centimeters acetic acid (99 per cent) + 50 liters of water.

Certified, Coleman & Bell, Northwood, Ohio









DUCK DISEASE STUDIES I: BLOOD ANALYSES IN  
DISEASED BIRDS.

PAUL A. SHAW.







### Duck Disease Studies I: Blood Analyses in Diseased Birds.

PAUL A. SHAW. (Introduced by O. D. Leake.)

*From the Hooper Foundation for Medical Research of the University of California.*

It has long been observed that ducks and other migratory birds which settle about inland marsh lands and shallow lakes reputed to contain "alkali waters" develop characteristic symptoms resulting frequently in heavy mortality. A systematic study of this disease has been proposed through the co-operation of the California Fish and Game Commission, the Hooper Foundation for Medical Research, and the Department of Pharmacology of the University of California Medical School. This report is the first of a series to be made in connection with this study.

This report deals with blood chemistry studies on diseased birds from the San Joaquin Valley district in comparison with normal healthy birds. Four blood constituents, non-protein-nitrogen, uric acid, blood sugar, and chlorides, have been studied on 13 normal and 15 diseased ducks of the pintail or sprig species (*Dafila acuta*). Blood samples were taken directly from the heart and determinations made on protein-free filtrates according to the Folin and Wu system of analysis. Rectal temperatures were obtained preliminary to taking the sample.

The results indicate an average increase of 50% in non-protein-nitrogen, and an 80% increase of uric acid, in the diseased birds. In the chlorides, computed as sodium chloride, a barely significant average increase was noted. The range of blood sugar values was too wide to warrant comparisons. The body temperature of sick specimens averaged 3.5° F. below normal. The results on normal birds are shown in Table I and those for diseased birds in Table II. In the diseased birds there appeared to be a relationship between non-protein-nitrogen, uric acid and body temperature, the figures

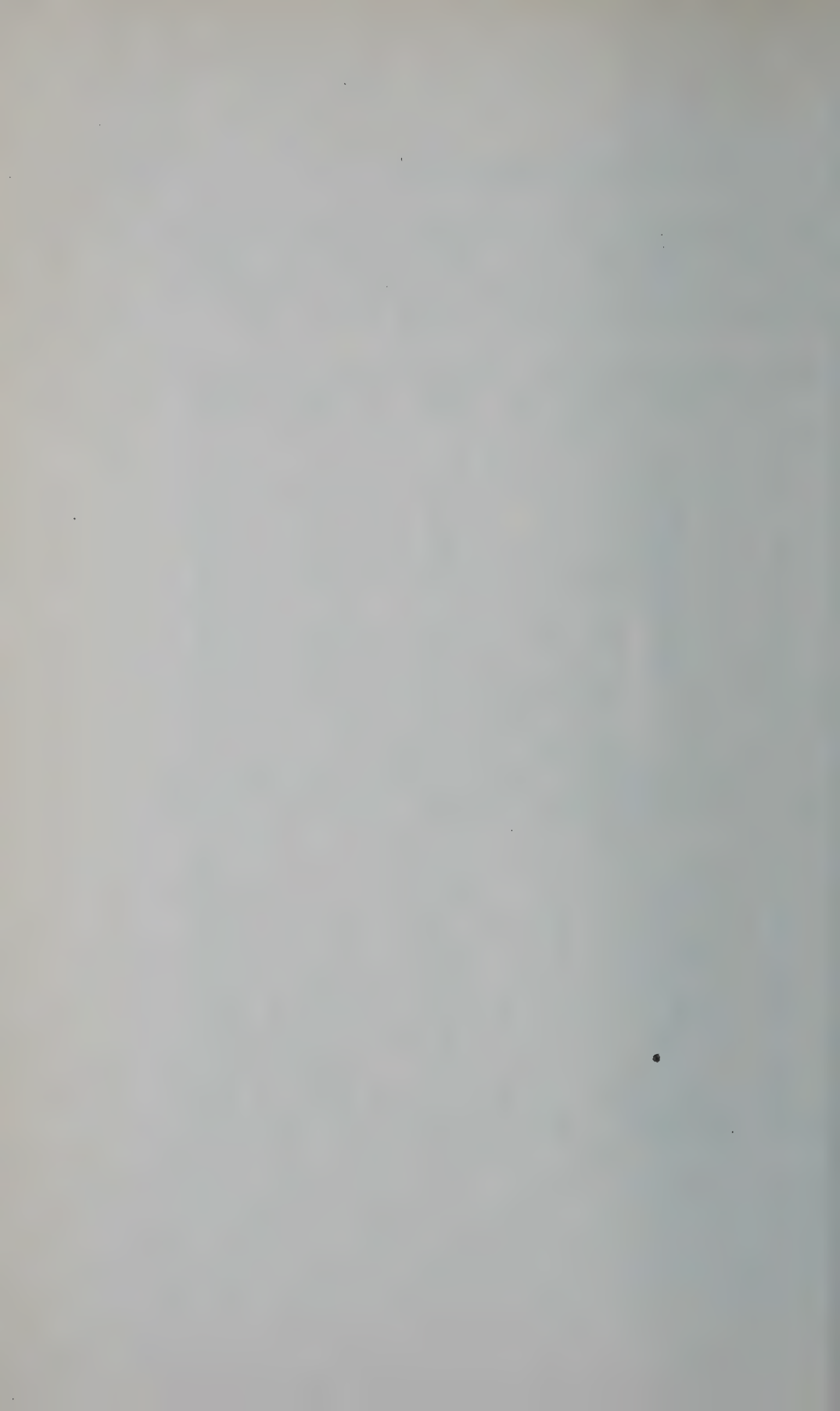
obtained for these constituents increasing with increase of temperature. The 2 lowest figures for non-protein-nitrogen were obtained in the sickest birds, in one case the value lying below the minimum normal. The values were highest in the birds that were apparently nearing recovery, as evidenced by their ability to walk or fly.

TABLE I. *Normal Birds.*

Bird No.	Rectal Temp. °F.	Non-Protein-Nitrogen mg./100 cc.	Sugar mg./100 cc.	Uric acid mg./100 cc.	Chlorides % NaCl
1	110	43	120	9.2	0.41
2	111	40	138	6.6	0.48
3	110	39	157	9.3	0.44
4	109.5	39	151	6.7	0.47
5	109.1	39	148	7.6	0.44
6	108.5	40	136	4.5	0.48
7	110.4	38	177	6.4	0.47
8	108.8	38	172	4.5	0.50
9	107.5	35	148	4.4	0.47
10	108	37	179	6.4	0.47
11	111	40	208	8.0	0.46
12	109.3	37	220	6.1	0.48
13	109.5	40	154	7.0	0.44
Average	109.5	39	162	6.7	0.46

TABLE II. *Diseased Birds.*

Bird No.	Rectal Temp. °F.	Non-Protein-Nitrogen mg./100 cc.	Sugar mg./100 cc.	Uric acid mg./100 cc.	Chlorides % NaCl
1	104	48	300	—	0.46
2	105	36	163	9	0.45
3	102	28	200	10	0.53
4	106	52	160	11	0.56
5	108	68	138	10	0.47
6	107	60	145	12	0.47
7	108	56	126	10	0.47
8	107	80	153	15	0.44
9	104	58	200	10.5	0.51
10	108	68	143	11	0.47
11	106	52	162	12	0.52
12	106	55	150	8.5	0.49
13	108 •	59	204	12	0.55
14	105	144	137	34	0.60
15	107	53	153	10	0.49
Average	106	60	170	12	0.49









DUCK DISEASE STUDIES: II. FEEDING OF SINGLE  
AND MIXED SALTS.

PAUL A. SHAW.



4635

Duck Disease Studies: II. Feeding of Single and Mixed Salts.

PAUL A. SHAW. (Introduced by C. D. Leake.)

*From the Hooper Foundation for Medical Research of the University of California.*

One phase of the duck disease study previously outlined<sup>1</sup> is an investigation to determine the probability of "alkali poisoning" as the cause of this malady. This report deals with preliminary data obtained in the forced feeding of salts and mixtures of salts, such as are known to occur naturally in some of the disease areas.

Male and female ducks of the pintail species, weighing from 600-800 gm. were used for the experiments. The salts were fed in solution ordinarily, by means of a pipette, but in a few instances

TABLE I.

	Salt	Gm. Fed	Result
1.	Sodium Chloride .....	1.57.....	Non-toxic.
2.	" " .....	4.72.....	Non-toxic.
3.	" " .....	6.00.....	Death in 4 days.
4.	" " .....	7.90.....	Death in 36-45 hours.
5.	" " .....	15.80.....	Death in 2 hours 25 minutes.
6.	Magnesium Chloride .....	0.40.....	Non-toxic.
7.	" " .....	1.00.....	Non-toxic.
8.	" " .....	1.50.....	Paralysis starting in 40 min. and lasting 5-6 hours.
9.	" " .....	3.00.....	Paralysis starting in 30 min. and lasting 5-6 hours.
10.	" " .....	3.60.....	Vomiting in 10 minutes, paralysis in 20 minutes, lasting 5-6 hours.
11.	" " .....	4.50.....	Paralysis in 5 minutes and death in 15 minutes.
12.	Calcium Chloride .....	1.38.....	Non-toxic.
13.	" " .....	4.80.....	Great depression in 15 minutes and death in 35 minutes.
14.	Sodium Sulphate .....	2.60.....	Non-toxic.
15.	Sodium Nitrate .....	0.50.....	Non-toxic.
16.	Magnesium Nitrate .....	0.20.....	Non-toxic.

<sup>1</sup> Shaw, P. A., PROC. SOC. EXP. BIOL. AND MED., 1929, xxvii, 6.



# PROCEEDINGS

TABLE II.

Ion	Exp. No.	Relative %							
		1	2	3	4	5	6	7	8
Sodium .....		36.0	35.7	32.7	34.0	34.9	33.3	34.1	18.0
Chloride .....		42.0	37.0	44.0	44.0	37.0	39.6	45.0	31.0
Sulphate .....		12.0	10.5	10.9	11.0	10.5	15.9	18.0	27.0
Nitrate .....		10.0	8.8	9.1	9.5	8.8	8.7		
Calcium .....				3.3			0.8	1.0	0.8
Magnesium .....					1.5		0.8	0.9	0.8
Bicarbonate .....						8.8	0.9	1.0	0.8
Potassium .....									21.6
Nitrite .....			8.0						
Mgm. per dose .....		730	830	805	778	830	838	728	887
No. of doses .....		3	1	3	3	3	3	3	4
Interval between doses, hrs.		1.7	—	1.7	1.7	1.7	2.5	2.0	1.5
Total dose in gm. ....		2.2	0.83	2.4	2.3	2.5	2.5	2.2	3.5
Toxic period, hours .....		0		0	3-9	5-8	5-8	0	2—
Hours to death .....			1				8		6-16

were fed dry in capsules. Some data on single salts are shown in Table I and on mixtures in Table II.

The results indicate that less than 5 gm. of sodium chloride is non-toxic; while 6 gm. or more is lethal, the time required to produce death decreasing as the dose is increased. Toxicity appears after administration of 1.5 gm. magnesium chloride, but an amount approximately 4.5 gm. is required for a lethal dose. Calcium chloride totaling 1.4 gm. was non-toxic, while 4.8 gm. was lethal in 35 minutes.

The symptoms of sodium chloride toxicity were nausea, general depression, and torticollis. Magnesium chloride produced a typical paralysis, rendering the bird entirely helpless for the period during which the effect lasted. With calcium chloride the ante mortem symptoms appeared to be general depression rather than paralysis. Details of the symptoms produced, together with the blood and pathological changes, will form a separate report.

Data of particular significance were obtained from the administration of certain mixtures, a marked increase in toxicity being noted in those solutions which contained nitrate together with either magnesium or bicarbonate. It should be noted in Experiment 3 that calcium with nitrate did not produce a similar toxicity, nor was toxicity developed in Experiment 7 in which magnesium and bicarbonate were used but no nitrate.

The greatest toxicity was found in Experiment 2, in which sodium nitrite was added to the solution used in Experiment 1. In this connection it may be significant that qualitative nitrite tests made on the solutions, after standing in the laboratory for 2 weeks, gave

## DUCK DISEASE STUDIES

negative results in Experiment 1 and positive results in Experiments 3, 4 and 5, showing a reduction of nitrate to nitrite apparently through the action of calcium, magnesium or bicarbonate ion, depending on the respective cases.

Toxicity was also obtained by substituting potassium for a portion of the sodium as indicated by comparison of Experiments 7 and 8. It is true that a larger total was fed in the case of the potassium mixture but it should also be noted that toxicity appeared shortly after administration of the second dose. In the 8 experiments listed in Table II the minimum dose was 0.83 gm. and the maximum 3.5 gm., 6 of the experiments using practically a constant amount of 2.2 to 2.5 gm. In all 8 cases the relatively non-toxic salts sodium chloride and sodium sulphate compose 76.0 to 97.1% of the total.









## OBSERVATIONS ON SNUFFLES IN RABBITS

F. RENE VAN DE CARR AND KATHLEEN J. KILGARIFF

*From the Department of Bacteriology, University of California, Berkeley*

The etiology of snuffles, a disease of the respiratory tract of rabbits, which seriously interferes with many laboratory studies, and frequently becomes epidemic, has not been established conclusively, despite the numerous observations recorded by McCartney and Olitsky,<sup>1</sup> Webster,<sup>2</sup> De Kruif,<sup>3</sup> Tanaka,<sup>4</sup> and others, recently reviewed by Meyer.<sup>5</sup> In the majority of instances in which careful bacteriologic studies were conducted, two organisms, *Bacillus bronchisepticus* and *Bacterium lepi-septicum*, were isolated from the nasal passages, sinuses, and respiratory tree. Although it is definitely established that *B. lepi-septicum* alone is invariably associated with pleuropneumonia, pericarditis, septicemia, sinus, and middle ear infection; differences in opinion seem to exist between Tanaka<sup>4</sup> and Bull and McKee,<sup>6</sup> on one hand, and Webster<sup>2</sup> on the other hand, concerning the causative organisms in acute snuffles.

In the light of these differences, we thought it would be of interest to conduct further studies on this respiratory infection, which had developed in the animal house of the department of bacteriology.

The investigations were carried out during the months from September to December, 1927. The animals under observation were stock rabbits, raised in the department. Among them snuffles had been endemic for some time. Many of them had been used by the class in medical bacteriology and therefore represented all types of experimental inoculations; the rest were so-called normal stock animals. Routine examinations were conducted on the series as follows: clinical examination; isolation of suspected colonies from field cultures and classification of them according to biochemical reactions and according to their morphology in staining with Gram's stain and toluidin blue; serologic tests for agglutination; allergic tests; detection of carriers by the use of silver nitrate; and postmortem examinations.

Received for publication, June 4, 1928.

1. J. Exper. Med., 1923, 38, p. 591.

2. Ibid., 1924, 39, p. 837.

3. Ibid., 1922, 35, pp. 561 and 621.

4. J. Infect. Dis., 1926, 38, p. 389.

5. Newer knowledge of bacteriology and immunology, 1928, p. 607.

6. Am. J. Hyg., 1925, 5, p. 530.

## OBSERVATIONS

*Bacteriologic Examinations.*—For the isolation of the organisms of the nasal passages a sterile swab was passed well into the nasal fossa. The mucoid material was then thoroughly streaked on freshly prepared, 6% defibrinated rabbit blood beef infusion agar, and the plate incubated 24 hours. Colonies were picked and studied further in their biochemical reactions. It was found that certain strains of *B. lepi-septicum*, when successively transplanted to plain agar, lost fermentative power; but if they were replanted on freshly prepared, defibrinated blood agar, after two or three subcultures they would again react characteristically with the carbohydrates; *B. lepi-septicum* fermented glucose, mannitol, and sucrose, while *B. bronchisepticus* (also known as *Alkaligines bronchisepticus*) failed to attack the sugars.

The type of colonies of *B. lepi-septicum* which were looked for on the plates were small, fluorescent, slightly raised colonies, with round, even borders and with centers sometimes opaque; similar colonies with somewhat irregular borders; and the same general type of colony, but more opaque and mucoid.

From 5 to 10 suspected colonies were picked from each swab culture. These were transplanted to freshly prepared, defibrinated rabbit blood agar plates and incubated 24 hours. Transplants to sugars, and smears, were made from these growths. Considerable experience was required to recognize these colonies of the flora of the rabbit respiratory tract on plate cultures. De Kruif's<sup>3</sup> observation that typical colonies of *B. lepi-septicum* disintegrated when touched with the loop was confirmed in every case, and proved to be helpful. *B. bronchisepticus* and *B. lepi-septicum* could not be distinguished morphologically. Both were gram-negative, bipolar rods. Sometimes they were short and coccoid; sometimes, fairly large and slender, resembling diphtheroids. They frequently were arranged in chains, and then were streptothrix-like. In order that the data might be dependable, the nasal passages of the rabbits were not considered free from *B. lepi-septicum* or *B. bronchisepticus* until from 3 to 5 independent swab cultures, taken at different intervals, had been analyzed.

A total of 108 animals were studied together with approximately 500 cultures. Clinically the rabbits of this series could be divided into two groups: rabbits with typical snuffles—marked by nasal discharge, matting and loss of hair on the four paws and around the head, coughing and sneezing, and, in a few cases, torticollis, as a result of middle ear infection; and clinically healthy rabbits either carrying *B. lepi-septicum* or *B. bronchisepticus* in the nares or free from these organisms, as revealed by cultures. It is possible, of course, that in some cases one or both of the organisms were present in the nasal passages, but escaped detection even after repeated examinations. The results, as recorded in table 1, indicated that in the 57 rabbits with clinical cases of snuffles, as well as in the 41 carriers, the two organisms *B. lepi-septicum* and *B. bronchisepticus* were present in approximately equal numbers. Only 10 (10.8 %) of the animals were normal.

*Serologic Tests.*—Recent papers on the relation of *B. lepi-septicum* and *B. bronchisepticus* to "snuffles," failed to indicate that serologic

tests had been used to detect infected animals. In this study tests for agglutination were carried out with polyvalent serums obtained from the same series of rabbits.

For antigens, several 24 hour cultures of *B. bronchisepticus* grown on beef infusion agar, were pooled and washed 5 times in sterile, distilled water. The suspension used for the tests was standardized in distilled water to prevent spontaneous clumping. A similar antigen was made from pooled 24 hour cultures of *B. lepi-septicum* grown on 6% defibrinated blood, beef infusion agar, the blood being obtained from a normal rabbit. The antigen was made as before, but was suspended in salt solution. After the suspensions had been added to the dilutions of serum they were allowed to stand in a water bath at 52 C. before being read.

TABLE 1.—THE RELATION OF BACTERIOLOGIC OBSERVATIONS IN SNUFFLES TO ITS CLINICAL INCIDENCE

Result of Bacteriologic Examinations	Animals Showing Clinical Symptoms 57	Animals Showing No Symptoms 51
<i>B. lepi-septicum</i> .....	17 (29.83%)	12 (23.5%)
<i>B. bronchisepticus</i> .....	17 (29.83%)	15 (20.5%)
<i>B. lepi-septicum</i> and <i>B. bronchisepticus</i> .....	23 (40.35%)	14 (27.5%)
Absence of <i>B. lepi-septicum</i> and <i>B. bronchisepticus</i>	0	10 (19.5%)

TABLE 2.—CORRELATION BETWEEN THE SERUM AGGLUTINATION AND THE BACTERIOLOGIC FINDINGS IN RABBITS WITH SNUFFLES

Antigens	Incidence of Agglutination in Serum Dilutions of 1:10 to 1:80	Bacteriologic Observations in the Rabbits from Which Serums Were Drawn				Correlation, %
		<i>B. Lepi- septicum</i>	<i>B. Bronchi- septicus</i>	<i>B. Lepi- septicum</i> and <i>B. Bronchi- septicus</i>	Animals Free from Organism	
<i>B. lepi-septicum</i> .....	{ 63 present	21	16	26	0	74.6
	{ 35 absent	8	16	11	0	45.7
<i>B. bronchisepticus</i> ....	{ 64 present	19	21	24	0	70.3
	{ 34 absent	12	10	12	0	35.3

The failure of a number of the serums from rabbits that yielded the organisms in bacteriologic examination to agglutinate the organisms, may be explained by the fact that the rabbits, in some cases, were probably in a state of incipient infection. It is reasonable to assume that a somewhat prolonged state of infection was necessary before antibodies against *B. lepi-septicum* and *B. bronchisepticus* might be demonstrated. The distribution of the agglutination is shown in table 3.

In general, the observations indicated that in the case of infections with *B. lepi-septicum* and *B. bronchisepticus*, systemic reactions occurred of varying intensity, as expressed by the agglutination reactions. From the observations it may be concluded that both organisms are sufficiently pathogenic to excite a general response to the nasal infection.



*Allergic Tests.*—It seemed desirable to have criteria other than agglutinations to demonstrate the systemic response to the invasion of the respiratory tract by *B. lepi*septicum and *B. bronchisepticus*. Therefore, cutaneous allergic tests were used in these studies, because of their wide applicability in the detection of a general body reaction to bacterial infection.

For the allergens, the organisms were grown in the same manner as for the agglutination tests, were washed 5 times in physiologic salt solution, and a 6th time in distilled water, and each was alkalized to approximately  $P_H$  8. They were then placed in a water bath at 52 C. for 3 days. The suspensions were then brought back to neutrality with acid. Tricresol, in 0.3% solution, was added to preserve the allergens, and these were kept at 37 C. for one week. Tests for sterility showed no growth at the end of this time in subculture. These autolysates were kept on ice until needed.

TABLE 3.—THE DISTRIBUTION OF THE AGGLUTINATIONS IN THE SEROLOGIC TESTS IN SNUFFLES

Antigens	No Reaction	Reactions in Dilutions of			
		1:10	1:20	1:40	1:80
<i>B. bronchisepticus</i> .....	34	8	23	13	20
<i>B. lepi</i> septicum .....	35	14	17	9	23

TABLE 4.—THE CORRELATION BETWEEN SKIN REACTIONS AND THE AGGLUTINATION

Antigens	Reaction of Skin		Reaction of Serum		Correlation, %
	Positive	Negative	Positive	Negative	
<i>B. bronchisepticus</i> ....	69	..	49	20	71.0
	..	29	12	17	58.7
<i>B. lepi</i> septicum.....	75	..	55	20	73.3
	..	23	9	14	60.8

Intracutaneous injections of 0.2 cc. of each allergen were made on the shaven side of each animal in widely separated areas. The results were read at 24, 36 and 48 hours. A reaction was considered positive when it showed an indurated, inflamed area, with a central necrotic zone.

Since from the nature of the study no animal could be considered normal "a priori," the rabbits which gave negative results served as controls. Tables 4 and 5 show the correlation between skin reaction, the agglutination, and the bacteriologic observations.

Although the skin reactions checked closely with the serologic reactions, it was impossible, without further study, to evaluate them other than as indications of a systemic response to the respiratory infection with the organisms of which the allergens were composed.

Subsequent to the completion of these studies, Hanger<sup>7</sup> reported observations, in which he noted that Berkefeld filtrates of 72-hour cultures of *B. lepi-septicum*, *B. bronchisepticus*, *B. influenzae*, *B. coli*, and *Meningococcus* all individually call forth reactions when injected intracutaneously into rabbits exhibiting clinical snuffles. He concludes that skin reactions to gram-negative organisms are nonspecific.

In subsequent experiments we failed to substantiate Hanger's observations, using autolysates of *B. paratyphoid* B, *B. coli*, *B. aertrycke*, and *B. enteritidis*. These autolysates were prepared by the same method as the allergens with *B. lepi-septicum* and *B. bronchisepticus*.

TABLE 5.—THE CORRELATION BETWEEN SKIN REACTIONS AND THE BACTERIOLOGIC FINDINGS

	Number of Rabbits with Positive Skin Reactions	Bacteriologic Observations			Correlation, %
		B. Lepi- septicum	B. Bronchi- septicus	B. Lepi-septicum and B. Bronchi- septicus	
To <i>B. lepi-septicum</i> .....	69	22	19	23	72.5
To <i>B. bronchisepticus</i> .....	75	24	24	32	74.6

TABLE 6.—THE BACTERIOLOGIC FINDINGS AFTER TREATMENT OF THE RABBIT'S NOSTRILS WITH SILVER NITRATE

Condition of Rabbits	Number of Animals in Which Organisms Were Present	
	Before Silver Nitrate 44	After Silver Nitrate 22
<i>B. lepi-septicum</i> .....	36.5%	0
<i>B. bronchisepticus</i> .....	34.0%	64.0%
<i>B. lepi-septicum</i> and <i>B. bronchisepticus</i> .....	7.0%	36.0%
Negative for both organisms.....	23.5%	0
Clinical snuffles .....	0	54.0%

*Detection of Carriers.*—Silver nitrate (Freund<sup>8</sup>) was used with the principle in mind that by lowering the local resistance of the mucous membranes of the nasopharynx, a chronic infection with *B. lepi-septicum* could be changed into an acute condition which would manifest itself clinically. About 2 cc. of a 2% solution of silver nitrate was introduced into each nostril with an eye-dropper, care being taken not to transmit the infection from animal to animal; the droppers were sterilized in alcohol and rinsed in sterile salt solution each time. The results are shown in table 6. At this time 12 rabbits (54%) presented clinical snuffles, while 10 (46%) were still healthy. The results tended to confirm the

7. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1927, 35, p. 230.

8. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1926, 106, p. 627.

value of silver nitrate in the demonstration of a carrier state in clinically healthy animals.

#### SUMMARY

A systemic response of the rabbit to infection of the respiratory tract with *B. lepi*septicum and *B. bronchi*septicus, was demonstrated by serologic and allergic reactions. The serologic and allergic reactions correlate with the bacteriologic findings to a high degree: the allergic reactions to a higher degree than the serologic reactions. The allergic reactions were apparently specific. They may prove to be a simple, more direct method of detecting infected or immune rabbits.

*B. lepi*septicum or *B. bronchi*septicus, or both, were demonstrated in every case of clinical snuffles in this study. *B. lepi*septicum or *B. bronchi*septicus, or both together, may be responsible for snuffles in rabbits. In manifestations of acute snuffles, such as bronchopneumonia, pleurisy, pericarditis, and septicemia, *B. lepi*septicum alone was demonstrable.

A 2% solution of silver nitrate was found to be useful in separating the carriers from the uninfected animals in a group of clinically healthy rabbits.







## FOOD POISONING\*

### SOME EXPERIMENTAL ASPECTS

By J. C. GEIGER, M. D.  
San Francisco

Food poisoning, as it is understood today, is the result, directly or indirectly, of the consumption of food with certain bacteria. Clinically it may be classified as an intoxication. It is as old a condition as any of the diseases of the human being and consequently has been known by a much varied terminology.

### TWO TYPES OF FOOD POISONING

A scientific worker generally recognizes two types of food poisoning. One type is due to the contamination of the food with the paratyphoid group or other bacterial organisms, through the agency of a human or animal or from the meat of an animal suffering from a specific infection with these germs. Prompt incubation of the contaminated food by improper and insufficient cooking, refrigeration or storage, allows the bacteria to start their growth, a poisonous product, or, in the process of heating, certain products become soluble and evidently poisonous. The consumption of such food is followed within several hours by symptoms of nausea, abdominal pain, vomiting, prostration, diarrhea, and perhaps fever. The recovery within forty-eight hours is the

other type of food poisoning is known as botulism. It is due to the contamination of the food with a specific bacterium known generally as *Bacillus botulinus*. This germ is found in practically throughout the world. It exists in the form of a spore and as such is non-toxic. When so-called nonacid or slightly acid foods, such as many vegetables, fish, and meats, are preserved by faulty and unsanitary methods, botulinus poisoning may occur. The symptoms usually appear within twenty-four to thirty-six hours after the consumption of the contaminated food. There may be marked muscular weakness, disturbances of vision, loss of ability to swallow and talk, constipation, rapid pulse and normal temperature, rarely any pain, and finally respiratory failure. This somewhat insidious type of poisoning, so serious because of its high death rate, has apparently been eliminated from commercially canned foods. It is regrettable that the canning methods antedate the present knowledge of botulism and that, with a few exceptions, no effort has been made to correct this. Only boiling for a sufficient length of time or removal from the glass jar or can before

being served will make home-canned foods reasonably safe.

### COMPARATIVE PROCEDURES IN TWO TYPES OF FOOD POISONING

It is deemed important to point out briefly in a table the different investigative procedures that are suggested in outbreaks and the clinical symptoms in both types of food poisoning. This paper, however, will concern itself only with the first type under discussion. This type, popularly known as ptomaine poisoning, because of its relative statistical importance, has intrigued a number of investigators. Many of the factors operative in outbreaks, however, are experimentally and epidemiologically yet obscure.

### BACTERIA CONCERNED IN OUTBREAKS

The generally accepted causative bacteria in food-poisoning outbreaks of the first type under discussion are the paratyphoid-enteritidis group. *B. enteritidis* was isolated by Gärtner<sup>1</sup> in 1888 in an outbreak due to meat. The source of the meat was an animal slaughtered because of its being ill from enteritis. Hübener,<sup>2</sup> Savage and White,<sup>3</sup> Spray,<sup>4</sup> and Geiger<sup>5</sup> have also recorded outbreaks due to this organism. Besides specific infections and possible carriers in animals, another source of *B. enteritidis* is the commercial rat viruses which are not infrequently used for the destruction of rodents in and around food establishments, especially bakeries and canneries. Health agencies have not generally recognized this possible source of contamination and taken steps to regulate their use. Of the specific paratyphoid group, outbreaks have been attributed to *B. paratyphosus A* and *B* in the United States by Geiger.<sup>6</sup> At this point one of the numerous difficulties as to classifying causative bacteria now arises, because of the terminology as to subtypes of *B. paratyphosus B*. Likewise, the term "Salmonella group" is often used to add to the confusion. Furthermore, Savage and White<sup>3</sup> refer to "Mutton and Derby types." Jordan<sup>6</sup> has attempted to classify the matter of types by using the term *B. paratyphosus B* "Schottmuller type" and limiting such a type as coming from human sources. Many investigators, however, classify another type of *B. paratyphosus B* "Aertrycke type" and whose source is presumably from animals. It is this organism *B. aertrycke* which is supposed to be the commonly causative bacterium in most outbreaks of food poisoning.

The other bacteria involved in, or thought capable of causing outbreaks, are *B. suispestifer*, *B. pullorum*, and *B. anatum*. In fact, Geiger, Ward, and Jacobsen,<sup>7</sup> in a study of the bacterial flora of oysters, directed attention to the possibility that these are a number of organisms associated with various foods, but particularly meat products that are members of the paratyphoid-enteritidis group. Geiger and his coworkers<sup>8</sup> described an outbreak of food poisoning due to crab meat, and reported further work on the bacterial flora of market meat. They pointed out that many of these organisms do not lend themselves to classification

\*The Hooper Foundation, University of California, San Francisco.

Presented before the Pathology and Bacteriology Section of the American Medical Association at the Fifty-Eighth Session, May 6-9, 1929.

TABLE 1.—Comparative Procedures in Two Types of Food Poisoning

GENERAL FOOD POISONING	INCUBATION PERIOD	BOTULISM
Usually three to eight hours, rarely over twelve.	Usually twenty-four to forty-eight hours.	
Supportive and eliminative.	TREATMENT	Botulinus antitoxin, specific type; absolute eliminative.
INVESTIGATIVE PROCEDURE		
<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Use incubation period for basis of determining the causative meal.</li> <li>2. Always suspect freshly cooked or warmed-over foods. Preserved foods are rarely at fault. Foods are apparently good as to taste, appearance, odor and texture.</li> <li>3. Bacteriologic examination of excreta of patients and the suspected food for the paratyphoid group and other organisms. Feeding of mice with suspected food both direct and by stomach tube.</li> <li>4. Bacteriologic and epidemiologic search for human carriers and possible contamination from animal sources.</li> <li>5. Complications: appendicitis, cholecystitis, persistent elevation of temperature (paratyphoid infection).</li> </ol>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Use incubation period for basis of determining the causative meal.</li> <li>2. Always suspect preserved foods; likewise, products such as sausages. Spoilage of food noted in many instances.</li> <li>3. Test of suspected food for toxin by animal infection; mice, guinea-pigs or rabbits. Test food with specific antitoxin. Culture of suspected food for the presence of spores, particularly if food has been previously boiled.</li> <li>4. Search for domestic animals, such as chicken, for symptoms of limberneck, for corroborative and laboratory evidence.</li> <li>5. Complications: bronchopneumonia.</li> <li>6. Human outbreaks are usually due to Type A.</li> </ol>	
SYMPTOMATOLOGY		
Sudden onset; nausea, vomiting, abdominal pain, prostration, diarrhea and rise of temperature.	Delayed onset; marked muscular weakness; gastrointestinal symptoms, rare; disturbances of vision with diplopia and blepharoptosis; loss of ability to swallow and talk; constipation; rapid pulse; subnormal temperature; rarely any pain; death from respiratory failure.	
Mortality, 0 to 1 per cent. Case infectivity rate high.	Mortality over 60 per cent. Case infectivity rate usually 100 per cent.	

with any of the better known organisms. The presence in foods of any of these so-called "intermediate strains" seems to indicate unsatisfactory sanitary methods of handling foods and may be responsible for outbreaks of a gastro-intestinal nature. The health agencies investigating such not infrequent occurrences sometimes find bacteria present that are ordinarily considered innocuous or harmless, or cannot be identified as accepted members of known groups. Should the laboratory tests not be carried farther, or should the isolated unidentified bacteria be not blamed, negative reports may be made. This particular phase of the problem has been recently emphasized by Buchanan and his coworkers.<sup>9</sup> These authors accredit three outbreaks of food poisoning to *B. cloacae*. Geiger<sup>5</sup> had previously reported an outbreak due to *B. proteus*. Apparently, therefore, the numerous types of bacteria that can cause food poisoning are not limited to any particular group, or are perhaps unlimited provided certain biological conditions as to media, temperature, and possibly others, are fulfilled. Until these conditions are more fully understood, food poisoning will remain an interesting problem of many intricacies.

#### HEAT-STABLE POISONS IN FOOD POISONING

Most authorities agree that the clinical manifestations, namely, incubation period of several hours, abdominal pain, nausea, vomiting and diarrhea, and sometimes temperature, are those of an intoxication. The demonstration in the laboratory of a toxin or poison in the causative food, however, is apparently associated with technical difficulties. Even the production of experimental food poisoning, as demonstrated by Geiger and his coworkers,<sup>10 11</sup> with filtrates of known contaminated

foods is unusually rare.<sup>1 2</sup> Therefore the elucidation of the mechanism of the production of this type of poisoning from food has long been a problem. In fact, in many instances in alleged outbreaks neither an organism nor a toxin or poison has been demonstrated. Nor can the absence of an outbreak following the ingestion of contaminated food be fully explained, at least when some strains of *B. paratyphosus A* and *B* are concerned are isolated.<sup>5</sup> One difficulty to be surmounted has been to find a susceptible laboratory animal for experimental work. Branham and her associates have more recently Dack,<sup>13</sup> Cary, Harmon and Harmon and Jarra, all of the University of Chicago, have reported conflicting results in experiments performed. Where Branham used mice, she reported delayed results (5-10-14 days), while Dack and his associates used rabbits, monkeys, guinea pigs, and one cat with practically negative results. All of these workers reported the use of heat-killed cultures, thereby simulating to some extent the conditions usually found in outbreaks. Dack, Jordan, and Ward,<sup>14</sup> however, reported positive results in monkey by feeding living cultures. It is interesting to note that Dack had previously reported a negative result with one monkey was so fed. Savage and Geiger and others<sup>10 11</sup> have sought for the production of intestinal irritant substances probably produced by paratyphoid-enteritidis group. Gärtner<sup>1 2</sup> as early as 1888, observed significant clinical and toxicologic manifestations in mice fed with meat previously contaminated with *B. enteritidis* heated for one hour at 100 degrees. Bacteriologist Dyssegard<sup>15</sup> tested the toxicity of these organisms by injections of filtrates or boiled cultures. Geiger and Meyer,<sup>16</sup> in a preliminary report



have solved the technical difficulties. Authors record positive results when white mice fed whole heated cultures. The symptoms appear in a few hours and death usually in twenty-four hours. The pathological changes described a distended duodenum, the cecum, jejunum and ileum and the pleural cavity considered as pathognomonic for experimental food poisoning in mice. Rabbits, cats, and dogs were not affected in the same manner, monkey did show symptoms when fed with 0.5 centimeters of a potent poison.

Experimentally, there appears to be no doubt that stable poisons can be produced by a few bacteria usually classified as causative in outbreaks of food poisoning. Reports of outbreaks in the United States from food all contain heat-resistant bacterial poisons and are singularly lacking. Confirmation of one, however, has been offered by Pryer.<sup>17</sup> A recent preliminary report of Geiger and Pryer on experimental food poisoning appears to indicate that the white mouse is the most susceptible to certain bacterial poisons and, therefore, the logical laboratory animal for tests. It is quite possible that this laboratory phenomenon may be extended to include other organisms not so well known in food poisoning. It is hoped, therefore, to throw further light on the production of this interesting clinical entity.

Foundation, University of California.

# REFERENCES

1. Gärtner, W.: *Correspondenz-Blatter d. arztl. Vereins v. Thüringen*, 1888.
2. Hübener, E.: *Fleischvergiftungen und Paratyphusinfektionen*. Jena, 1910.
3. Savage and White: *British Med. Res. Council, Special Rep., Series 92*, 1925.
4. Spray, R. S.: *J. A. M. A.*, 86, 109, 1926.
5. Geiger, J. C.: *J. A. M. A.*, 81, October 1923.
6. Jordan, E. O.: *J. Infect. Dis.*, 36, 1925.
7. Geiger, Ward, and Jacobsen: *J. Infect. Dis.*, 38, March 1926.
8. Geiger, Greer, and White: *Am. J. Pub. Health*, 18, May 1928.
9. Buchanan, Enos B., and Emerson, McGrail: *J. Infect. Dis.*, March 1929.
10. Geiger, Davis, and Benson: *Am. J. Pub. Health*, 1924, 14, p. 578.
11. Geiger, et al: *Am. J. Pub. Health*, 1924, p. 309.
12. Branham, Rahey, and Day: *J. Bac.*, 1928, 15, p. 36.
13. Dack, Harmon, and Jarra: *J. Prev. Med.*, 1928, 11, No. 6. Dack, Cary and Harmon: *J. Prev. Med.*, 1928, 11, No. 6.
14. Dack, Jordan, and Ward: *J. Prev. Med.*, No. 6, November 1928.
15. Bahr and Dyssegard: *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1927, 102, p. 268.
16. Geiger and Meyer: *Proc. Soc. Exper. Biol. and Med.*, 1928, 26, No. 2, November 1928.
17. Pryer, R. W.: *Am. Jour. Pub. Health*, 19, 208, February 1929.





4154

Experimental Food Poisoning in White Mice with Heat Stable  
Paratyphoid Poisons.

J. C. GEIGER AND K. F. MEYER.

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University  
of California, San Francisco.*

A study of human outbreaks of food poisoning indicates that a severely irritant substance, probably produced by representatives of the paratyphoid-enteritidis group and other bacteria when growing on foods rich in protein, exerts its action on the alimentary tract. A number of workers (Savage and White,<sup>1</sup> Branham, Robey and Day<sup>2</sup> and others) have sought for experimental evidence of such an irritant. Most of the experiments were inconclusive or merely suggestive on account of the apparent insensitiveness of the animal in contrast to the human intestinal tube. Following the oral administration of living or dead paratyphoid bacilli a definite pathological reaction was either absent or unobtrusive; and delayed (5 to 10-14 days, Branham and Day) symptoms were produced unless a general infection was eventually set up. However, in this connection it must be recalled that Gärtner<sup>3</sup> as early as 1888 observed significant clinical and pathological manifestations in mice fed with meat previously contaminated with *B. enteritidis* and heated for 1 hour at 100°. A casual perusal of the literature indicates that the experiments of Gärtner have never been repeated on a large scale or with strains which have been recently isolated from outbreaks of food poisoning. The toxicity of these organisms is usually tested by parenteral in-

<sup>1</sup> Savage and White, Med. Res. Council, Special Rep., Series 91, 1925, 111.

<sup>2</sup> Branham, Robey and Day, *Arch. Path.*, 1928, v, 742; *J. Bacteriol.*, 1928, xv, 36.

<sup>3</sup> Gärtner, *Correspondenz-Blatter d. allg. arztl. Vereins v. Thüringen*, 1888, xvii, 590.

## SCIENTIFIC PROCEEDINGS

jections of filtrates or boiled cultures and not by systematic feeding experiments (Bahr and Dyssegaard<sup>4</sup>). These considerations suggested a renewed investigation. Although the studies are still in progress a number of interesting observations deserve wider recognition.

Under suitable experimental conditions which will be detailed elsewhere certain strains of *B. aertrycke* produce after an incubation time of 3 to 4 days at 37° C. a highly potent enterotropic poison. The active principle is present in filtrates in very potent concentrations, in heated whole fluid cultures. It acts both by intraperitoneal injection and by feeding with the aid of a catheter, or when mixed with bread. The production of symptoms and characteristic anatomical changes was practically universal when a particular strain in a special medium was heated for 10 to 60 minutes at 100° C. or subjected to a temperature of 240° for 10 minutes in the autoclave. Administered by catheter the sterile, heated poison was fatal to mice weighing approximately 20 gm. in some instances in 0.05 cc. and usually in 0.1, 0.2 and 0.5 cc. amounts. The heated media treated in an identical manner as the cultures are not poisonous.

TABLE I.

Fed 0.5 cc. of fluid culture of <i>B. aertrycke</i> grown 4 days—then sterilized by	No. of mice fed	No. of deaths	E lapse of time from feeding to death
1. 10 minutes at 100°	5	5	10-13 hours.
2. 60 minutes at 100°	5	3	3-13 hours.
3. Autoclaved 10 min. at 240°	5	5	1 in 7 and 4 in less than 24 hours.

Approximately 30 minutes after oral administration, the mice exhibit a quiet attitude; in from 60 to 180 minutes they may show uneasiness, excitement and spasms, roughened coat, labored and accelerated respiration. Later, the eyes are closed by a crusty exudate. Shortly before death, which occurs in from 6 to 12 to 24 hours, general weakness is not uncommon and the motionless animals are flattened out on the bottom of the cage. In approximately 50% of the poisoned animals the anus is soiled with fluid intestinal content or a plug of glassy mucous. On autopsy the distended abdomen is soft, and, on opening reveals a markedly distended duodenal loop and deeply injected moist but empty coils of the small intestines. The stomach, filled with a small amount of food, is frequently distended by the same bile tinged or some blood streaked mucous which is present in the ballooned duodenal loop. The

<sup>4</sup> Bahr and Dyssegaard, *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1927, cii, 268.

## FOOD POISONING WITH PARATYPHOID POISONS

mucosa is always injected and sometimes covered with petechia and small erosions. Soft or fluid chyme is found in the large intestines; the jejunum and ileum contain as a rule flakes of clear yellowish mucous. The spleen may be slightly enlarged and the liver is hyperaemic. In some instances both pleural cavities contain a blood tinged or straw colored fluid (0.2-0.5 cc.); the lungs are bright red and collapsed. Cultures from the heart blood, spleen and liver remain sterile, while those from the intestinal content fail to reveal representatives of the paratyphoid group. The distended duodenum, the hyperaemic jejunum and ileum and the pleural effusion are pathognomonic for experimental food poisoning in white mice. In the experience of the writers deaths occurring later than 48 hours after feeding are probably due to other causes than the paratyphoid poison which acts primarily on the duodenum and stomach but may extend its reaction down the intestines beyond the duodenum. Rabbits, guinea pigs and cats fed double lethal mouse doses by weight of the poison may present transitory and indefinite symptoms from which they rapidly recover. Their blood collected 2 weeks after the feeding of the poison usually agglutinates the paratyphoid bacilli in low dilutions.

Symptoms of food poisoning have been produced in a macacus monkey by feeding 10 cc. of a potent poison and its blood had an agglutination titre of 1/640 2 weeks later.





## A SURVEY OF AMEBIC DYSENTERY IN CHICAGO \*

---

CHARLES SPENCER WILLIAMSON, M.D.

BERTHA KAPLAN, M.S.

CHICAGO

AND

J. C. GEIGER, M.D.

SAN FRANCISCO

---

### INTRODUCTION

BY CHARLES SPENCER WILLIAMSON

The stimulus for the survey of which these reports are a summary lay in the fact that I had occasion to see in private practice within a very short time several cases of amebic dysentery occurring under rather unusual conditions.

The first patient had a very large hepatic abscess, which had been opened and drained, and the patient was steadily going down hill. It was stated that examinations of the pus had been made with negative results. I saw the patient after the abscess had been draining for a long time, and on a personal examination of the pus, which was of the typical anchovy sauce type, found typical endamebas in large numbers. Vigorous treatment with emetine caused a remarkable clearing up of the entire process in a short time. The patient was living in a downtown hotel.

A short time afterward another patient was seen, a middle aged man, living in the same hotel. This patient had a peculiar mass in the right quadrant, the nature of which was doubtful, but as the patient had a severe diarrhea, a stool examination was made, which disclosed myriads of amebas. The patient was immediately taken to the hospital and operated on. A large retrocecal abscess due to a perforation of the bowel was found, and in the pus from the abscess amebas were abundant.

The third patient was an Italian, who had, however, been in this country for many years and had always worked at the same job. His work was in the same

---

\* From the Department of Medicine, University of Illinois College of Medicine, and the Department of Health, City of Chicago.

building in which the hotel was located. It is interesting to note that this patient had been treated several times in a well known hospital for colitis, and a fatal prognosis had been made. The stools were of the typical bloody, mucoid type, and amebas were present in enormous numbers. In spite of the long duration of his illness, a perfect recovery was made under treatment with emetine.

The fourth patient was not seen by me, but in describing the other three cases to a colleague in pathology, I learned that another case had occurred in the hotel next door to the one mentioned, and that the patient had died without a diagnosis, the autopsy showing a foudroyant amebic dysentery.

The fifth patient was a traveling salesman, who spent a couple of months of each year at the hotel in question and when first seen had been residing there for several weeks.

At this point it could hardly be doubted that it was not merely fortuitous that these cases of dysentery should appear in such quick succession in one neighborhood, and a carrier among the food handlers seemed the most plausible explanation.

A meeting was arranged with the owners of the hotel, and when the matter was laid before them they responded quickly and heartily to the suggestion that the parasitologist of the Research Hospital of the University of Illinois make a careful survey of all the food handlers and kitchen help. This was accordingly undertaken by one of us (B. K.) and very shortly an active case of the disease was found among the kitchen help. At this time we requested a consultation with the health commissioner, who cooperated in every possible way and detailed one of us (J. C. G.), then assistant commissioner, to investigate the entire matter from the epidemiologic standpoint.

Following numerous consultations a study of the food handlers and kitchen help of a number of the more important Chicago hotels was undertaken. Before these studies were very far under way three additional private cases were seen by me, but in these three no connection with the previous cases could be made out. A detailed report of these investigations follows, together with a study of the incidence of endamebas in the population of Chicago at large.

In order to insure appropriate treatment for the carriers who were found, the commissioner ordered all such patients to the Research Hospital, where they were kept until freed from infestation.

The treatment was as follows: Emetine bismuth iodide, 3 grains (0.2 Gm.) daily, 1 grain (0.065 Gm.) being given after each meal, and emetine hydrochloride, one-half grain (0.03 Gm.) twice daily, hypodermically, for ten days. In some cases powdered ipecac was given through the duodenal tube. Soap suds enemas were followed by quinine irrigations (1:5,000 solution, gradually increased to 1:1,000) daily.

#### METHOD OF STUDY

By BERTHA KAPLAN

The examinations were carried out at the hotel. A room with a bath was obtained, and specimens were collected (by giving a glycerin suppository whenever necessary) in paraffined containers of 60 cc. capacity and examined immediately, one person being taken at a time. The greatest care was exercised in making the microscopic examinations for worms, ova and intestinal protozoa, with a special view to finding *Endameba histolytica* cysts as well as living forms. The work was done on the basis of two examinations per capita. All smears were made of the proper opacity ("reading opacity"), warm water being used for some smears, iodine (5 per cent aqueous solution of potassium iodide saturated with iodine and diluted with equal parts of distilled water before using) for others, and eosin (1:1,000 aqueous) preparations. The water preparations showed living forms as well as encysted protozoa, ova and worms. In the eosin preparations the living as well as the encysted forms remained as unstained refractile bodies, while everything else including the dead cysts stained pink. The iodine stained the encysted forms, making possible cytologic study.

This survey at the place where the cases of amebic dysentery occurred resulted in the uncovering of one case and two carriers of *Endameba histolytica*. Of the carriers showing encysted *Endameba histolytica*, one was a pantry girl and the other a vegetable girl. The clinical case occurred in a night cook (Assyrian) who had been ill with amebic dysentery for a number of weeks and had been treated by an Assyrian doctor who failed to report the case to the health department. This



cook, being on night duty, when the work is not very heavy, was able to pursue his duties most of the time, having stayed out only two or three days with the excuse that he was suffering with "stomach trouble."

The history obtained from this cook was not entirely satisfactory; he failed to give a history of having had amebic dysentery before but stated that he had always been in rather poor health. It is not possible to state definitely which of these three persons was the source of infection. Our own experiments and those of the English workers Walker and Sellards and of Dobell have shown that the living forms are not infectious; the living forms produce the clinical symptoms of amebic dysentery, and the encysted forms transmit the disease. Whether this patient had been a healthy carrier prior to developing the clinical symptoms, or whether he as well as the others with clinical amebic dysentery were victims of one or both of the carriers of encysted *Endameba histolytica* cannot be ascertained.

O'Conner and Wenyon in their work in Egypt found the largest number of carriers of amebic dysentery among the food handlers and prisoners. This may be explained on the basis of insanitary conditions of the soil as well as of the institutions. Food handlers working with vegetables coming from contaminated soil become infected, after which dissemination is very easy by careless workers and by means of flies. With food handlers in this country conditions are different. Most, if not all, of the vegetables come from soil free from amebas; but, should there be even one carrier in a kitchen this furnishes a ready means of disseminating the disease.

Most of the patients at Cook County Hospital gave a history of having worked on the railroad in the North or in the South and of having used stagnant water for drinking purposes; two of the patients had worked at the stockyards and two were ex-sailors, one coming from Egypt and the other having been in India. Some of the patients came from the South, and several stated that they had never been outside the city.

Among the 1,148 food handlers the protozoan infections were distributed as shown in table 1.

In these 1,148 persons, metazoan infections were found as follows: Seven showed ova of *Trichuris trichiura*; three showed ova and segments of *Taenia saginata*; three showed ova of *Necator americanus*

(one, a Mexican, having been here only six months, and two Filipinos), one showed *Ascaris lumbricoides* ova and another showed *Strongyloides stercoralis* in large numbers.

The number of flagellates, worms and ova might have been increased by administering salts, because most of the specimens obtained were from the lower bowel, the region of the ameba, whereas most worms and the flagellates are found in the small intestine. The number of specimens showing ova and worms might also have been enhanced by using concentration methods, but that was not convenient and since the important point at issue was the uncovering of cases of amebic infestation and carriers we were not so much concerned with the others.

TABLE 1.—*Protozoa Found in the One Thousand One Hundred and Forty-Eight Food Handlers*

Types of Protozoa	Number of Cases 27 Carriers (2 active cases)	Percentage
<i>Endameba histolytica</i> .....		2.35
<i>Endameba coli</i> .....	220	19.16
<i>Endolimax nana</i> .....	23	2
<i>Iodameba bütschlii</i> .....	61	5.31
<i>Trichomonas intestinalis</i> .....	21	1.82
<i>Chilomastix mesnili</i> .....	22	1.91
<i>Giardia intestinalis</i> .....	75	6.53

The distribution of the carriers and cases of *Endameba histolytica* was as follows: The active cases were found in a night cook at the place where the epidemic occurred, and in a coffee man, a young man who came from Louisiana and who had periodic attacks all the time that he was up here, getting enough treatment for temporary abatement of the diarrheal symptoms. This patient shifted from one hotel to another, and thus kept a few months in advance of us, as we were examining the help at the various hotels, until we finally found him in the last hotel in which examinations were made. He was immediately sent to the hospital, where he was kept until completely cured, as shown by proctoscopic examinations and repeated examinations of specimens of feces. The carriers were one vegetable salad girl, five fruit pantry girls, four cooks, three cold meat handlers, two bakers, one assistant fry cook, one waffle maker, one colored steward's assistant, one buf-

fet man, three dishwashers, one toast maker and three pantry men.

Immediately on the discovery of a carrier or case, the steward was notified and the person was sent to the hospital and kept there until proved to be free from the organisms, which was done as follows: A series of treatments was given, followed by a three day period of rest without treatment, after which three negative stools on successive days were required before the patient was dismissed from the hospital. Failure to obtain three negative stools was followed by another series of treatments, a period of rest without treatment and three negative stools on successive days.

#### INCIDENCE OF PARASITIC INFECTIONS AMONG THREE HUNDRED AND EIGHTY NORMAL PERSONS

Similarly 380 persons were examined at the rate of 1.22 examinations per capita, the concentration method being used in addition to the method already described with the aim of uncovering as many cases of infection with eggs and worms as possible. These specimens were obtained largely from patients at the University of Illinois Research Hospital Dispensary.

The examinations gave the results listed in table 2.

#### COMMENT

The results of various workers in protozoology as well as our own work indicate that amebic dysentery is not limited to the tropics and subtropics. The present increase of amebic dysentery may be due to a number of factors, including (1) the greater stress being placed on medical zoology in the college curriculum; (2) improved clinical laboratory examinations; (3) increased migration from the Southern to the Northern states, and (4) the reporting of these cases as a stimulus toward more thorough examinations of diarrheal stools.

Stools of persons with amebic dysentery can often be recognized macroscopically as well as microscopically. Amebic dysentery stools are bloody mucoid, free from macrophages and pus unless the case is of long standing, when secondary infections set in. On the other hand, stools showing a great deal of pus, rich in cellular exudate, some mucus and only now and then streaks of blood should be looked on with suspicion as being bacillary in nature. In all such cases bacterio-

logic examinations for dysentery bacilli should be made without any delay. Failure to find dysentery bacilli in cases of long standing does not rule out bacillary dysentery.

Extreme care should be exercised in examining freshly obtained specimens (preferably with a rectal tube or protoscopically) for amebas. This should be done immediately on discovering the symptoms and before treatment of the patient is begun. After specific treatment the organisms begin to disintegrate, making it difficult or even impossible to determine them. Occasionally under such conditions stained preparations are of assistance. However, all convalescents from amebic dysentery should be examined repeatedly for encysted *Endameba histolytica*. Periodic examinations should

TABLE 2.—*Protozoan and Metazoan Infections in Three Hundred and Eighty Normal Persons*

Types of Parasites	Number of Cases	Percentage
<i>Endameba histolytica</i> .....	4	1.05
	(2 active cases)	
<i>Endameba coli</i> .....	31	8.10
<i>Endolimax nana</i> .....	3	0.78
<i>Iodameba bütschlii</i> .....	7	1.66
<i>Trichomonas intestinalis</i> .....	4	1.05
<i>Giardia intestinalis</i> .....	7	1.66
<i>Chilomastix mesnili</i> .....	6	1.57
<i>Trichuris trichiura</i> .....	4	1.05
<i>Oxyuris vermicularis</i> .....	2	0.52
<i>Taenia saginata</i> .....	2	0.52

be made of the stools after the patients are discharged from the hospital.

#### EPIDEMIOLOGY FOR CHICAGO, 1926-1927, INCLUSIVE

By J. C. GEIGER

This investigation represents the first attempt to study epidemiologically cases of amebic dysentery reported to the Chicago Department of Health. The data are not complete even for the years under discussion since, as shown in table 3, some cases probably have never been fully reported. Likewise, in the assembled data there are noticeable gaps in the accumulated evidence due in part to the time that has elapsed since many of the cases were investigated. It is reasonable to assume, however, that this study did stimulate reporting by physicians and as a result there is presented an apparently marked



increased endemicity for Chicago. Naturally, this increase is of more than passing local interest, as it fully demonstrates the presence of the disease to a significant extent.

It must be appreciated, however, that this increase may be entirely due to recent careful investigation rather than to an unusual local parasitic index. Moreover, the extent to which the presence of amebic

TABLE 3.—*Dysentery in Chicago*

Year	AMEBIC	Cases	Deaths
1921.....	..	..	4
1922.....	..	..	2
1923.....	..	..	3
1924.....	..	..	6
1925.....	..	..	4
1926.....	..	63	11
1927.....	..	28*	3†
BACILLARY			
1921.....	..	..	1
1922.....	..	..	2
1923.....	..	..	1
1924.....	..	..	1
1925.....	..	..	2
1926.....	..	4	0
1927.....	..	3*	0†
UNSPECIFIED			
1921.....	..	..	2
1922.....	..	..	0
1923.....	..	..	0
1924.....	..	..	0
1925.....	..	..	0
1926.....	..	0	2
1927.....	..	0*	0†
TOTAL			
1921.....	..	..	7
1922.....	..	..	4
1923.....	..	..	4
1924.....	..	..	7
1925.....	..	..	6
1926.....	..	67	13
1927.....	..	31	3†

\* Ten months' data.

† Nine months' data.

dysentery has been recognized in Chicago fully justifies this study and the plea to local practitioners to regard with suspicion all cases of chronic diarrhea and to confirm the clinical diagnosis of dysentery by suitable laboratory examinations.

Furthermore, once the local endemic index for amebic dysentery has been established by the reporting and laboratory confirmation of cases over a known period of years, the health official may determine how valuable the follow-up work, so necessary in such so-called

imported diseases, has been in the elimination of possible foci of infection.

#### SUMMARY

The number of cases in this study (150) is doubtfully exact. Particularly is this to be considered true because of the comparative importance of table 3. It will be noted that in the years 1921, 1922, 1923, 1924 and 1925, though deaths from both amebic and bacillary dysentery are recorded, no cases are reported. The logical reason for this phenomenon is that probably physicians never regarded either disease as reportable except in 1926 and 1927, when this investigation awakened anew their interest, at least in amebic dysentery, from a public health standpoint.

It is exceedingly important to note that practically the same number of deaths from amebic dysentery were reported for each year from 1921 to 1927, or a yearly average of 3.6 each, the exception being in 1926, when eleven deaths occurred. In the 150 cases recorded here there were eighteen deaths, or a percentage case mortality of twelve. In addition, twenty-nine carriers (two active cases) were discovered in the course of our investigation of food handlers in large local hotels.

Likewise, in this series (150) of cases, 106 were men, 39 were women and five were children under 15 years of age. Eighty-three cases were verified by laboratory data, or a percentage of 55. This percentage of positive observations (55), however, has been mainly due to efforts of the past year to have corroborative laboratory observations in every case reported. It was interesting to note that of some of the epidemiologic factors brought to light, foreign travel figured in only fifteen patients, and two of these were born in foreign countries. An additional five were born in states of the United States bordering on the Gulf of Mexico. In a family of three, one of whom was a child, the possible etiologic factor was stated to be foreign missionary work. In the carriers discovered in the local hotel survey, however, eighteen, or approximately 64 per cent, were of foreign birth. In the remainder (ten) it is most interesting to note that these gave their place of birth as the United States and, in the majority, Chicago.

When occupation was considered as a possible epidemiologic factor, the investigation revealed a wide

range, among which salesmen, housewives and laborers head the list. There were also included three physicians, one dentist and three nurses. Such occupations as broker, manufacturer, policeman, alderman, showman, musician, opera singer, machinist, houseman and painter were among those listed. Curiously, two restaurant employees were also listed. The most important epidemiologic factor, of course, as far as the Chicago cases are concerned, appears to be the carriers in local hotels. Our data as to this point are not susceptible of statistical analysis, as only five of the patients gave their residence as hotels in which carriers who were food handlers were discovered. Naturally, one would suspect that the carrier played more of a rôle than this in the epidemiology of amebic dysentery in Chicago, but the actual amount of harm done by these carriers will probably always remain obscure for the years under discussion.

#### CONCLUSIONS

1. Amebic dysentery is not uncommon in Chicago and has been frequently overlooked.
  2. Careful examinations of freshly obtained specimens of feces in cases of colitis and diarrhea showing bloody mucus enable one to make the diagnosis easily.
  3. In postdiarrheal stages diagnosis may usually be readily made by finding encysted *Endameba histolytica*.
  4. Our results show that in Chicago the number of protozoan infections among food handlers is greater than among other persons taken at random.
- 25 East Washington Street.









4434

Relationship of Atopens of Timothy (*Phleum Pratense*) and Australian Rye (*Lolium Multiflorum*) Grasses as Indicated by Passive Transfer Studies.

EDWARD MATZGER. (Introduced by K. F. Meyer.)

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco.*

There is an assumption that the atopens of timothy grass pollen contain atopens that will protect patients who are sensitive to other grasses. The basis for this belief has been the clinical evidences of satisfactory results. Coca and Grove added the weight of experimental evidence to this hypothesis when they demonstrated that the timothy atopens contained the atopens of June, orchard and red top grasses. Botanical surveys of the San Francisco and peninsula areas indicate that Australian rye grass pollen is an important factor in pollen hypersensitiveness. It was of interest to determine whether the timothy atopens might contain the rye grass atopens and this question was studied experimentally on human beings by means of the local transfer technic. The observations which will be detailed elsewhere show definitely that the timothy atopen does not contain the rye grass atopen while, on the other hand, the rye grass atopen does contain the timothy atopen. It is quite evident that the treatment of patients with timothy pollen extract alone will not protect patients who are clinically exposed to rye grass pollen. On the contrary, however, a definite group of patients who are exposed to timothy pollen may be protected by the use of rye grass extract.







## TULAREMIA IN NEVADA\*

By J. C. GEIGER, M. D.

AND

K. F. MEYER, Ph. D.  
San Francisco

SAN FRANCISCO, in a number of papers, has stressed the importance of tularemia from a public health standpoint. The appearance of the disease has been noted in many states. Opportunity has been given the writers to survey the State of California as to the endemicity and, for matter of fact, the facts learned are briefly noted.

The simultaneous appearance of six cases of tularemia in the Southern Pacific Hospital at San Francisco, California, from Nevada in August attracted considerable attention. At the request of Dr. W. B. Coffey, chief surgeon of the Southern Pacific Railroad, and in coöperation with Dr. E. E. Hamer, state health officer, an investigation was made.

### EXTENT OF THE INVESTIGATION

The actual area visited was indeed small. However, the area of information covered is considered sufficiently to be practically the center of the tularemia in the state lines of California, Oregon, and

the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco.

Utah. One proved case, however, has been seen from the southeastern portion of the state.

### NUMBER OF CASES OFFICIALLY REPORTED

Apparently the State Health Department took official notice of tularemia in 1926 and an admirable bulletin by Albert in August 1926 was their first and only publication regarding the presence of tularemia in Nevada. This publication called attention to fifteen cases. The records of proved cases found in the State Hygienic Laboratory at Reno was seventeen in 1926, five in 1927, and fourteen in 1928, a total of thirty-six cases for the period of 1926 to 1928, inclusive. Since then the records of fourteen additional proved cases are available, making fifty in all.

Full information is only obtainable from the records of proved cases. Of these, forty-two were male and eight female; only four were children, none under ten years. The source of the infection was attributed to rabbits in thirty-two cases; to tick bites, seven; to fly bites, six; to injuries and probable contact with contaminated material, four; and one to mosquito bites.

### PROBABLE INCIDENCE OF THE DISEASE

The officially reported and proved cases (fifty) as often occurs, do not represent the actual incidence. The first cases from our data occurred in Nevada in 1912 near Battle Mountain, and the first proved case occurred in 1926 near Reno. In all, fifteen physicians were interviewed in wide areas of the state. These can be roughly divided

TABLE 1.—*Proved Cases of Tularemia in Nevada, 1926*

Location	Age	Sex	Type	Diagnosis Proved	Source of Infection	Month Infected
	10	M.	Gland	Yes	Rabbits	June
Black	13	F.	Gland	Yes	Rabbits	June
Winnemucca	50	M.	Gland	Yes	Rabbits	June
Black	13	F.	Ulcer	Yes	Not known (possibly ticks)	June
	44	F.	Ulcer	Yes	Rabbits	June
Winnemucca	55	M.	Ulcer	Yes	Rabbits	June
Winnemucca	15	M.	Gland and Ulcer	Yes	Rabbits	June
	50	M.	Gland and Ulcer	Yes	Rabbits	June
Winnemucca	52	F.	Gland and Ulcer	Yes	Rabbits	June
	50	F.	Gland and Ulcer	Yes	Rabbits	June
Winnemucca	38	M.	Gland and Ulcer	Yes	Rabbits	June
	40	M.	Gland and Ulcer	Yes	Sheep (butcher burr in thumb)	June
Winnemucca	42	M.	Gland and Ulcer	Yes	Rabbits	June
	50	M.	Gland and Ulcer	Yes	Handling sheep hides	June
Winnemucca	41	M.	Gland and Ulcer	Yes	Fly bite	July
	49	M.	Gland and Ulcer	Yes	Rabbits	July
	35	M.	Gland and Ulcer	Yes	Fly bite	July

TABLE 2.—*Proved Cases of Tularemia in Nevada, 1927*

Location	Age	Sex	Type	Diagnosis Proved		Profitable Source of Infection	Month Infect
				Aggluti-nation	Animal Inoculation		
Yerington	35	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	June
Yerington	40	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	June
Gardnerville	45	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	June
Yerington	40	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	July
Winnemucca	39	M.	Gland and Ulcer	Yes		Deerfly	August Reported by Drs. H. and Taussig, University of California Hospitals
Gardnerville	26	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	July

as being situated in western and eastern sections of Nevada. The physicians in the western section speak of cases occurring only from 1926, while those from the eastern section speak of cases occurring from 1912. These physicians (N. A.

Paradis, F. H. Harper, Sparks; George William Edwards, Yerington; Charles R. P. Roantree, A. J. Hood, John A. Va Shaw and Haas, Elko; E. H. Hawkins Clark, Battle Mountain; George F. Pope,

TABLE 3.—*Proved Cases of Tularemia in Nevada, 1928*

Location	Age	Sex	Type	Diagnosis Proved		Probable Source of Infection	Month Dis
				Aggluti-nation	Animal Inoculation		
Winnemucca	40	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Apr
Grass Valley	34	M.	Gland and Ulcer	Yes		Tick bite	Ma
Reno	55	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits (Alturas, Calif.)	Jur
Midas	32	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Jur
Reno	18	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits (Alturas, Calif.)	Jur
Ruby Valley	24	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Jur
Palisade	37	F.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Jur
Wimberly	32	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Jul
Winnemucca	17	M.	Gland and Ulcer	Yes		Deerfly	Jul
Yerington	40	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Jul
Elko	50	M. Indian	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Jul
Battle Mountain	50	M.	Gland and Ulcer	Yes		Deerfly	Jul
Ruby Valley	28	M.	Gland and Ulcer	Yes		Tick bite	Jul
Ruby Valley	39	F.	Gland and Ulcer	Yes		Deerfly	Jul
Mound House	30	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Aug
Beowawe	31	M.	Gland and Ulcer	Yes		Unknown lesion on foot	Aug
Pine Valley	10	F.	Gland and Ulcer	Yes		Attributed to mosquito bite	Aug
Yerington	23	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	Aug

TABLE 4.—*Proved Cases of Tularemia at Southern Pacific Hospital, San Francisco, 1928*

Location	Age	Sex	Type	Diagnosis Proved		Source of Infection	Month Infected
				Agglutination	Animal Inoculation		
Vegas Nevada)	30	M.	Gland and Ulcer	Yes	Yes Culture	Rabbits	June
cks	35	M.	Gland and Ulcer	Yes		Deerfly	July
cks	40	M.	Gland and Ulcer	Yes	Yes Culture	Tick bite (Alturas, Calif.)	July
cks	35	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	July
	24	M.	Gland and Ulcer	Yes		Rabbits	July
shone	30	M.	Gland and Ulcer	Yes		Ticks	August
shone	28	M.	Gland and Ulcer	Yes		Ticks	August
nberg	38	M.	Typhoidal	Yes		Ticks	August
	28	M.	Gland and Ulcer	Yes	Yes	Rabbit Used knife to skin rabbits and later cut finger on knife	September

zy, E. D. Giroux, Winnemucca) report, careful questioning, having seen 243 cases of tularemia, none of which have heretofore been reported. Again, two of these physicians report that cases had been seen before 1928, but they do not venture stating the number. It is very important to note that no deaths are reported in this series of 243 unofficial, and 50 official and proved cases, or in a total of 293 cases. From these figures one can only conclude that tularemia is a disease in human beings is widespread in Nevada, and has probably existed since 1928. It could be stated, however, that though tularemia is endemic the group incidence is low. As shown in the Shoshone cases. Shoshone railroad construction camp of approximately 50 men, all living practically under similar conditions. Two cases only were reported for 1928 in this more or less medically supervised group.

#### PROBABLE SOURCE OF THE INFECTION OF THE HUMAN CASES

The wild rabbits are generally considered the chief animals affected, and the chief source of infection in man, careful inquiry was made accordingly. The widespread death of rabbits has been universally noted in western Nevada in 1926. R. Sans of the United States Biological Survey indicated that the rabbit mortality extended into California, Oregon, and Idaho, but not west of Black Rock Desert in Nevada. He stated that the Biological Survey was engaged in studying the poisoning, and quoted the death of 4500 rabbits on a 300-acre ranch. He considered tularemia as a chief aid to their destruction. His opinion as to the absence of deaths in the rabbit population of western Nevada in recent or past years is not substantiated by the opinion of local physicians. Local physicians point out that the rabbit popula-

tion recently has been diminished, as it has been in years past, by some form of rabbit disease. They even go so far as to talk about seven-year cycles of increased prevalence of rabbits followed by an increased death rate. It is not unlikely, as the record seems to indicate, that the wild rabbits of Nevada have the disease in chronic form. Many are killed in apparently healthy condition only to cause human cases by contact. In fact, the killing of rabbits and their subsequent shipping for use as food may be a source of danger to the shipper, the transportation company, and the seller and user. Notwithstanding that the great reservoir of infection may be rabbits, ticks, flies, and perhaps mosquitoes, though information regarding mosquitoes is most vague. Such bizarre methods of transmission as dogs licking open wounds, coyote pup bites (both dogs and coyotes having been known to have been chasing rabbits), the wiping of hay knives on machines after cutting through and into rabbits nesting in the hay, barbed-wire cuts, the handling or shearing of sheep, have been noted in our series of cases. In addition, and of what importance, we do not as yet know, one patient only handled turkeys dead from an unknown disease. In our data there is recorded the death of one hundred chickens owned by a physician who fed them rabbit meat and liver. This physician's wife was seen with tularemia, probably from handling the rabbits fed to the chickens, but no examination was made of the chickens.

#### COMMENT

Tularemia has probably been endemic in Nevada since 1912. There appears to be every type of transmission—rabbits, flies, ticks, contact with other animals apparently healthy such as dogs, coyotes, and sheep, and with such extraneous material as knife blades and barbed-wire. However,



no cases have been noted in this series as being due to contact with human cases. The question of immunity of the Indians of Nevada was continually brought to the fore. There is a record of one proved case in a Piute, and other cases have been seen in the Shoshones. It could be stated that, though the wild rabbits have always been a source of meat for the Indians in Nevada, the cases of tularemia in them are rare, or that the Indian is or has become wiser than his white brother. The endemicity of tularemia in the human depends on the disease in the rabbit and the infected blood-sucking insect population of the district. It would appear that in Nevada both of

these factors are unusually and definitely present. The mortality rate in the human cases in Nevada, however, has been nil, but final recovery has been exceedingly slow.

Every variety of treatment was suggested, but efficacious, but methods such as mercuric iodine intravenously, salvarsan intravenously, the use of phenol as a counterirritant in glandular cases, the use of acid mercuric nitrate and arsenical paste as a cautery agent applied to the initial lesion, and the use of the ultra-violet lamp, seem to have failed on account of their nonspecificity.

George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California.

PREPARATION OF SPECIFIC SERUMS AND TECHNIC  
OF AGGLUTINATION TEST WITH PASTEURELLA  
PESTIS DETOXIFIED WITH FORMALDEHYDE

A. BATCHELDER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco, California*

The agglutination test and the production of *Pasteurella pestis* serum of high agglutination titer and specificity for diagnostic use by the injection of killed cultures into rabbits has for three reasons always been a time consuming procedure of doubtful value. First, the plague bacillus normally grows in broth as flocculent aggregates and on agar as a sticky film which invariably washes off in coarsely granular suspensions. Second, salt solution suspensions tend to disintegrate and autolyze. Heating enhances this process and phenol does not prevent it. Third, rabbits under prolonged immunization refuse to eat, lose weight rapidly, succumb readily to intercurrent infections, and may develop a motor paralysis evidently due to liberated endotoxins.

D'Aunoy<sup>1</sup> with the aid of a dangerous filtration procedure finally obtained an antigenic suspension of uniform turbidity which did not clump spontaneously. Cautious and prolonged immunization with suspensions of heat-killed organisms as antigen resulted in such a low titer and such a marked loss of weight, that he finally resorted to the use of suspensions of living organisms attenuated by growth at 45 C. in alcohol broth. The work of D'Aunoy was fully confirmed in this laboratory and although good results may be obtained by the use of living attenuated cultures it is doubtless a dangerous procedure not to be recommended or generally used.

Furthermore the use of living plague bacilli in the macroscopic agglutination test as generally practiced since it is believed to be the only reliable procedure (Dieudonné and Otto<sup>2</sup>), is always subject to some danger. The recent observations of numerous investigators<sup>3</sup> with other bacteria left no doubt that formaldehyde properly used

Received for publication, March 12, 1929.

1. J. Infect. Dis., 1923, 33, p. 391.

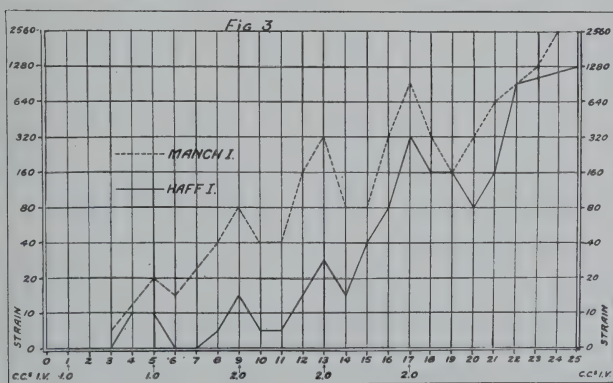
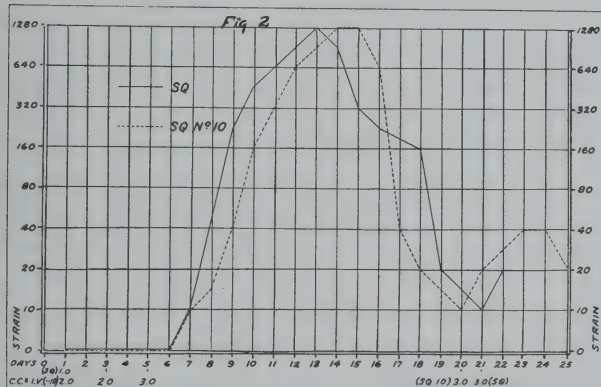
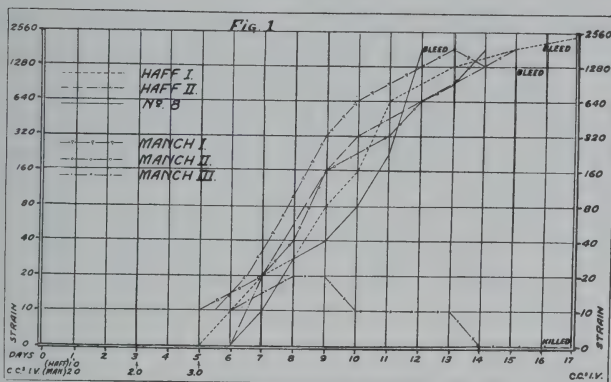
2. Handbuch d. pathog. Mikroorganismen, 1927, 4 (Lfg. 3), p. 240.

3. Wherry, W. B., and J. A. Bowen: J. Infect. Dis., 1925, 37, p. 520.

would overcome the difficulties just enumerated. It appeared highly probable that formalin would detoxify the *Pasteurella pestis* without affecting their antigenic value. It would prevent disintegration of the cells and since it would fix the capsular substance it would also facilitate the preparation of uniform suspensions. These expectations have been fully justified as the experiments suggested by K. F. Meyer and detailed below indicate.

*Antigen Preparation.*—Blake bottles filled with a good surface of hormone agar containing .025% of fresh 10%  $\text{Na}_2\text{SO}_3$  were seeded with 1.0 cc. of an 18-hour hormone broth culture of *Pasteurella pestis*. After 24 hours incubation at 28 C., the surface growth of each Blake bottle was washed off with 20 cc. of 0.85% NaCl solution,  $\text{P}_\text{H}$  6.6 to 6.8, to every 100 cc. of which 0.25 cc. of neutral formaldehyde had been added. The resulting suspension which was invariably sterile after 7 to 8 hours at room temperature<sup>4</sup> in a stoppered bottle would sometimes be smooth and occasionally quite granular in texture depending, as far as could be determined, on the amount of artificial cultivation. Strains 8, Sq. Cal., Haff. I, Haff. II usually grew as moist colonies and antigens from these strains gave invariably an even stable suspension while strains Manch I, Manch II, Manch III and Sq. 10 as a rule gave a quite dry and very sticky growth. The suspensions were consequently granular. In these cases, however, a few minutes vigorous shaking followed by filtration through cotton and gauze would produce an even stable suspension. These original suspensions composed of from 25 to 35 billion organisms per cc. were kept in the icebox as stock for over one and a half years. During this time no microscopic evidence of autolysis became apparent and stained preparations made at regular intervals always presented a field of evenly stained isolated individual cells on a background containing very little if any cell debris. In this connection, however, it should be noted that as the suspensions became older, although there was no apparent physical change, immunization became a little more difficult in that more injections were required to produce the same response in an animal of the same age and weight. In the immunization of animals the original suspension was used without dilution but for agglutination tests a dilution in 0.85% NaCl solution was made to contain 2,500,000,000 cells per cc. and 0.1% formaldehyde.

4. According to Abel, *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1897, 21, p. 510, 0.44% formaldehyde kills plague bacilli within 3 hours.





*Immunization of Rabbits.*—In the course of 2 years 20 rabbits have been immunized with 8 pure strain antigens detoxified in the manner outlined above. One animal died from an intercurrent infection and one failed to respond to the injections. The remaining 18 animals furnished specific serums of slightly varying potency. The serologic response in the form of agglutinin curves for 8 rabbits is graphically presented in figure 1.

Although the titer rarely exceeded 1:1280 dilution, the reaction was highly specific and with the formalinized antigens heavy flocculent readily visible precipitates were secured. Not only did the serum serve in the identification of various rodent and human strains isolated in California but they were also successfully employed in a series of absorption tests with *Pasteurella muricida*, *B. pseudotuberculosis rodentium*, etc. Comparative series with antiplague serums obtained from the Institut Pasteur and the Schweizerische Serum Institut in Bern proved the superior quality of the rabbit serums and thus confirmed the observations of Kling and Hesser.<sup>5</sup>

Previous experience with phenolized antigens and heat killed suspensions and the experience of D'Aunoy indicate that preliminary immunization should be conducted slowly and with caution; however, with antigens prepared as above, it was found that intravenous inoculations with as high as 25 to 35 billion organisms per cc. could be begun at once and could be followed quite rapidly with larger intravenous inoculations without serious loss of weight or of toxic paralysis.

Three intravenous inoculations given every other day followed by a 10 to 14-day rest interval produced an agglutinating serum with a titer between 1:1280 and 1:2560. Smaller inoculations at 4 to 5 day intervals over a longer period of time (fig. 3) would sometimes stimulate a higher titer but the outcome was less certain and the slight increase in titer, did not warrant the extra time necessary. A rabbit with a high titer serum may rapidly lose the antibodies and a reinoculation will never restore the original potency. These observations are quite in accordance with finding recently reported by Howard.<sup>6</sup>

During one year the titer of the serum and the agglutinability of the antigens has remained constant. However, since the immunizing properties of the antigens slowly decrease with storage the preparation of fresh bacterial suspensions for the inoculation of animals is recommended.

5. Uppsala Läkaref. Förh., 1921, 26, p. 1; Hygiea, 1921, 83, p. 625.

6. Compt. rend. Soc. de biol., 1928, 98, p. 495.

## SUMMARY

*Pasteurella pestis* antigens prepared with 0.85% sodium chloride solution containing 0.25% formalin are killed within 7 to 8 hours. The suspensions are smooth and stable. Immunization of laboratory animals for the production of agglutinating serums may be readily accomplished by giving a small number of very large intravenous doses of such antigens in rapid succession. The serums so produced are of moderately high titer, but highly specific. The agglutination reaction with suspensions and serums produced in this manner is of the readily visible, flocculent type.









## CUTANEOUS IMMUNIZATION AGAINST *B. AERTRYCKE* IN THE GUINEA-PIG

HAROLD L. AVERILL AND K. F. MEYER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco, California*

For a number of years one of us (Meyer)<sup>1</sup> has attempted to analyze the mechanism of the immunity response which follows an intracutaneous injection of filtrates, vaccines, etc. It appeared superfluous to study the phenomena more carefully until the facts reported by Besredka and his followers<sup>2</sup> with human pathogenic microbes mostly noninvasive by the cutaneous route had been confirmed with organisms responsible for spontaneous infections in laboratory animals. Furthermore, since Besredka stresses the importance of organotropism for various bacteria it appeared desirable to ascertain if it might be possible to cuti-immunize either locally or generally against an organism for which the skin is in all probability not the receptive tissue. An enterotropic organism, *B. aertrycke* (*B. enteritidis* Breslau, *B. pestis caviae*) of guinea-pig origin which caused general infections when fed and when injected intracutaneously was chosen for the study to be reported in this communication.

### EXPERIMENTS

*Exper. 1.*—The antiviral used in this experiment was prepared from a culture of *B. aertrycke* grown for 12 days at 37 C. in shallow layers of hormone broth. After passage through a Berkefeld candle the filtrate was found to be inhibitive for the original organism. Nine normal guinea-pigs received intracutaneously on the abdomen 0.2 cc. of the antiviral-filtrate. Six additional animals received the same amount subcutaneously. After intervals of 24, 48 and 72 hours these animals were tested intracutaneously with a uniform dose of a suspension of moderately virulent organisms (8-hour agar slant suspensions) in salt solution. The suspension was standardized for all of the tests to contain six billion *B. aertrycke* per cc. The time of immunization was arranged so that the test might be applied to all the guinea-pigs at the same time

Received for publication, March 12, 1929.

1. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1926, 23, p. 730; J. Infect. Dis., 1929, 44, p. 489.

2. Local immunization (translation), 1927.

thus eliminating variation in dosage due to differences in the suspensions. As controls, 15 guinea-pigs were prepared in an identical manner using sterile hormone broth in place of the antiviral. The tests were made in the same manner. Eight additional guinea-pigs which had received no preliminary preparation were injected intracutaneously with the virulent culture at the same time. The data of this experiment are summarized in table 1.

The intracutaneous injection of the filtrate produces definite, reddened, moderately indurated infiltrations varying in size. On the other hand the virulent culture even in sublethal doses induces severe local reactions; at the site of the injection large and very hard areas of infiltrations, which later suppurate appear within 4 to 5 days. Later the necrotic slough is replaced within 3 to 5 weeks by a scar. For a few days the guinea-pigs appear sick, lose weight but later they recover promptly and show with the exception of the local reaction no general symptoms.

From the data presented in table 1 it is evident that the antiviral applied intracutaneously or subcutaneously confers a considerable degree of protection provided the massive infective dose which invariably produced within 3 to 8 days a fatal and generalized disease, is introduced not sooner than 48 to 72 hours after the treatment. Of 15 animals treated with antiviral, 10 survived the test in inoculation, while only 5 of the 15 prepared with sterile broth recovered. The resistance is neither localized nor is it confined to the skin alone. Guinea-pigs treated with filtrates intracutaneously proved refractory to an infective inoculation on any portion of the skin and even the subcutaneous tissue under the infiltrated area of the integumentum. Equally interesting is the fact that the subcutaneous injection of filtrates conferred rapidly a localized protection against an infection in the same area of the subcutis. The resistance of the guinea-pigs treated subcutaneously on the abdomen and infected subcutaneously in the back must in all probability be attributed to a general factor of resistance, which requires at least 72 hours for its development. Whether the local tissue response provoked by the intracutaneous or subcutaneous treatment, readily recognizable by the inflammatory reaction, merely retarded the invasion of *B. aertrycke* and disposed of the bacteria at the site of the inoculation or whether the vaccination protected nonspecifically the susceptible cells, must remain undecided. Regarding the nature of the cells susceptible to the paratyphoid bacillus in the guinea-pig nothing definite is known. The

TABLE 1.—EXPERIMENT 1: CUTI-IMMUNIZATION AGAINST *B. AERTRYCKE*  
IMMUNITY TESTED AFTER INTERVALS OF 24, 48 AND 72 HOURS

Normal Guinea-Pigs	Weight, Gm.	Treatment Injection on Abdomen	Interval Hours	Immunity Tests with Suspension of Young Organisms: Intracutaneous (IC) or Subcutaneous (SC)	Results	Agglutination Titer for Surviving Animals
1	370	0.2 cc. filtrate intracutaneously	24	IC, same area on abdomen	Death, 9 days	
2	480	0.2 cc. filtrate intracutaneously	48	IC, same area on abdomen	Recovery	1:320
3	460	0.2 cc. filtrate intracutaneously	72	IC, same area on abdomen	Recovery	1:40
4	490	0.2 cc. filtrate intracutaneously	24	IC, on back	Death, 8 days	
5	410	0.2 cc. filtrate intracutaneously	48	IC, on back	Recovery	1:1280
6	490	0.2 cc. filtrate intracutaneously	72	IC, on back	Recovery	1:40
7	470	0.2 cc. filtrate intracutaneously	24	SC, same area on abdomen	Death, 8 days	
8	400	0.2 cc. filtrate intracutaneously	48	SC, same area on abdomen	Recovery	1:2560
9	410	0.2 cc. filtrate intracutaneously	72	SC, same area on abdomen	Recovery	1:1280
10	460	0.2 cc. filtrate subcutaneously	24	SC, same area on abdomen	Recovery	1:1280
11	390	0.3 cc. filtrate subcutaneously	48	SC, same area on abdomen	Recovery	1:80
12	310	0.2 cc. filtrate subcutaneously	72	SC, same area on abdomen	Recovery	1:2560
13	340	0.2 cc. filtrate subcutaneously	24	SC, on back	Death, 5 days	
14	315	0.2 cc. filtrate subcutaneously	48	SC, on back	Death, 9 days	
15	370	0.2 cc. filtrate subcutaneously	72	SC, on back	Recovery	1:640
16	330	0.2 cc. broth intracutaneously	24	IC, same area on abdomen	Death, 8 days	
17	400	0.2 cc. broth intracutaneously	48	IC, same area on abdomen	Death, 17 days	
18	390	0.2 cc. broth intracutaneously	72	IC, same area on abdomen	Recovery	1:40
19	370	0.2 cc. broth intracutaneously	24	IC, on back	Recovery	1:1280
20	380	0.2 cc. broth intracutaneously	48	IC, on back	Death, 8 days	
21	350	0.2 cc. broth intracutaneously	72	IC, on back	Recovery	
22	320	0.2 cc. broth intracutaneously	24	SC, same area on abdomen	Death, 4 days	
23	370	0.2 cc. broth intracutaneously	48	SC, same area on abdomen	Death, 5 days	
24	430	0.2 cc. broth intracutaneously	72	SC, same area on abdomen	Recovery	1:160
25	400	0.2 cc. broth subcutaneously	24	SC, same area on abdomen	Death, 6 days	
26	330	0.2 cc. broth subcutaneously	48	SC, same area on abdomen	Death, 6 days	
27	350	0.2 cc. broth subcutaneously	72	SC, same area on abdomen	Death, 11 days	
28	310	0.2 cc. broth subcutaneously	24	SC, on back	Death, 2 days	
29	400	0.2 cc. broth subcutaneously	48	SC, on back	Death, 19 days	
30	320	0.2 cc. broth subcutaneously	72	SC, on back	Recovery	1:60
31	350	Shaved abdomen only	..	IC, same area	Death, 3 days	
32	430	Shaved abdomen only	..	IC, same area	Death, 8 days	
33	460	Shaved abdomen only	..	IC, on back	Death, 5 days	
34	400	Shaved abdomen only	..	IC, on back	Death, 6 days	
35	410	Shaved abdomen only	..	SC, same area	Death, 2 days	
36	330	Shaved abdomen only	..	SC, same area	Death, 8 days	
37	400	Shaved abdomen only	..	SC, on back	Death, 6 days	
38	410	Shaved abdomen only	..	SC, on back	Death, 3 days	



lymphatic tissues of the intestines, the mesenteric lymph nodes, etc., play the rôle of the primary foci of localization (see discussion for human typhoid by Oeller<sup>3</sup>) following an enterogenic infection but in the course of a cutaneous or subcutaneous invasion of virulent bacteria it is quite likely that the bacteria never reach the intestinal canal. However, the high agglutination titer of the blood serum of the recovered animals indicates that the test bacteria reached certain antibody producing tissues. And it is reasonable to assume that the active substance of the filtrate stimulated the same tissues. The immunity which follows cutivaccination is general and neither local nor confined to the receptive cells. Carefully conducted serologic studies on guinea-pigs treated intracutaneously with filtrates have shown that the serum of the animals not only acquires 72 to 96 after the injection definite bactericidal but also agglutinating (1:5 to 1:10) properties.

*Exper. 2, Series.*—The first experiment was repeated in an identical manner. A fresh antiviral was prepared as before with the aertrycke strain which had been repeatedly passed through the peritoneal cavity of guinea-pigs. The latter procedure was chosen in order to enhance either the virulence or the toxicity of the strain. It was anticipated that the passage strain would in all probability demonstrate more clearly the localized specific protection which might be induced by filtrates than an organism of moderate virulence and toxicity. Guinea-pigs of the same size and obtained from the same breeder as used in the first experiment were used. The interesting data of the series are summarized in table 2.

Although an increased virulence of the test strain was anticipated it did not manifest itself very strikingly in the untreated control animals which succumbed to the infection in from 1 to 7 days (first experiment 2 to 8 days). However, 8 of the guinea-pigs treated subcutaneously with broth and 4 injected in a like manner with filtrate died within 24 hours. The necropsy revealed the signs of an intoxication although bacteriologically the aertrycke organism could be demonstrated in the blood stream and in the organs. Obviously the repeated passage of the strain increased the toxicity and the subcutaneous injection of broth or filtrates either lowered the resistance to or aided the absorption of the toxin. The latter explanation is probably the correct one since the intracutaneous injection of the bacterial suspension was into only one control animal followed by an immediate intoxication. In fact, the filtrate rendered the treated skin area not only resistant against the toxin

3. Ztschr. f. klin. Med., 1922, 95, p. 328.

TABLE 2.—EXPERIMENT 2: CUTI-IMMUNIZATION AGAINST *B. AERTRYCKE*  
IMMUNITY TESTED AFTER INTERVALS OF 24, 48 AND 72 HOURS

	Normal Guinea-Pigs Weight, Gm.	Treatment Injection on Abdomen	Interval Hours	Immunity Tests with Suspension of Young Organisms: Intra- cutaneous (IC) or Subcutaneous (SC)	Results	Aggluti- nation Titer for Surviving Animals
1	440	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	24	IC, same area on abdomen	Recovery	1:640
2	380	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	48	IC, same area on abdomen	Recovery	1:640
3	410	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	72	IC, same area on abdomen	Recovery	1:320
4	320	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	24	IC, on back	Death 11 days	
5	320	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	48	IC, on back	Recovery	1:80
6	400	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	72	IC, on back	Death, 7 days	
7	400	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	24	SC, same area on abdomen	Death, 9 days	
8	360	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	48	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
9	320	0.2 cc. filtrate intra- cutaneously	72	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
10	290	0.2 cc. filtrate sub- cutaneously	24	SC, same area on abdomen	Death, 5 days	
11	390	0.2 cc. filtrate sub- cutaneously	48	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
12	410	0.2 cc. filtrate sub- cutaneously	72	SC, same area on abdomen	Death, 11 days	
13	410	0.2 cc. filtrate sub- cutaneously	24	SC, on back	Death, 1 day	
14	380	0.2 cc. filtrate sub- cutaneously	48	SC, on back	Death, 5 days	
15	400	0.2 cc. filtrate sub- cutaneously	72	SC, on back	Death, 14 days	
16	320	0.2 cc. broth intra- cutaneously	24	IC, same area on abdomen	Death, 5 days	
17	400	0.2 cc. broth intra- cutaneously	48	IC, same area on abdomen	Recovery	1:80
18	400	0.2 cc. broth intra- cutaneously	72	IC, same area on abdomen	Death, 5 days	
19	400	0.2 cc. broth intra- cutaneously	24	IC, on back	Death, 2 days	
20	410	0.2 cc. broth intra- cutaneously	48	IC, on back	Death, 12 days	
21	400	0. cc. broth intra- cutaneously	72	IC, on back	Death, 6 days	
22	350	0.2 cc. broth intra- cutaneously	24	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
23	330	0.2 cc. broth intra- cutaneously	48	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
24	470	0.2 cc. broth intra- cutaneously	72	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
25	330	0.2 cc. broth sub- cutaneously	24	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
26	380	0.2 cc. broth sub- cutaneously	48	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
27	430	0.2 cc. broth sub- cutaneously	72	SC, same area on abdomen	Death, 1 day	
28	400	0.2 cc. broth sub- cutaneously	24	SC, on back	Death, 1 day	
29	315	0.2 cc. broth sub- cutaneously	48	SC, on back	Death, 5 days	
30	350	0.2 cc. broth sub- cutaneously	72	SC, on back	Death, 1 day	
31	500	Shaved abdomen only	..	IC, same area	Death, 7 days	
32	420	Shaved abdomen only	..	IC, same area	Death, 5 days	
33	410	Shaved abdomen only	..	SC, on back	Death, 1 day	
34	480	Shaved abdomen only	..	IC, on back	Death, 6 days	
35	500	Shaved abdomen only	..	SC, same area	Death, 6 days	
36	470	Shaved abdomen only	..	SC, same area	Death, 1 day	
37	490	Shaved abdomen only	..	SC, on back	Death, 7 days	
38	470	Shaved abdomen only	..	SC, on back	Death, 4 days	

but also against the bacterial multiplication. This specific resistance was primarily confined to the small area previously injected with the filtrate. But the delayed deaths of some of the treated guinea-pigs indicated again that not only from the strictly local and specific but also a weak general nonspecific cutaneous resistance may be induced by the intracutaneous or subcutaneous application of filtrates or broth against an intracutaneous injection of virulent organisms. As might be anticipated this immunity mechanism directed against the toxin operated more effectively 48 to 72 hours after the treatment than after the first 24 hours. During this period no serum immune bodies could be demonstrated and the histologic study of the skin and subcutis of the control animals merely indicated a mild inflammatory reaction. Whether or not these changes are responsible for the altered biologic behavior cannot be decided from the material thus far available.

The guinea-pigs which survived responded 3 weeks after the last inoculation with serum agglutinins in moderate concentrations. These reactions indicate that the animals became infected since filtrate alone was incapable of stimulating the production of agglutinins in dilutions above 1:10. Subsequent experiment proved such guinea-pigs to be immune to oral and intraperitoneal infections.

The experiments with *B. aertrycke* support the findings of many workers (Hach and Melinjk,<sup>4</sup> Kollath and Herfarth,<sup>5</sup> Lange<sup>6</sup> and others) that the treatment of the integumentum with broth or peptone solutions containing bacterial protein enhances the immunity mechanism of the skin against various types of cocci. From the published data one might conclude that the altered reactivity of the skin operates with any type of micro-organism and with considerable regularity. This is, however, not the case. Extensive experiments<sup>7</sup> in this laboratory with streptococci of animal and human origin, with a highly virulent Friedlander's bacillus of guinea-pig origin, with *Vibrio septique* and *Clostridium chauvoei* on guinea-pigs and mice, failed to exhibit an immediate local immunity. Cutaneous or intracutaneous applications of filtrates or vaccines only protected a certain percentage of animals against fatal cutaneous infections and then only when a general immunity had been established. In the course of these experiments one could not escape the impression that the confirmation or negation of the observa-

4. Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap., 1927-1928, 54, p. 269.

5. Centralbl. f. Bakteriol., 1, O., 1928, 106, p. 120.

6. Deutsch. med. Wchnschr., 1927, 53, p. 714.

7. Hertert and Meyer: J. Infect. Dis., 1929, 44, p. 489.

tions made by Besredka is largely dependent on the virulence and toxicity of the microorganisms and the age of the animals. With a moderately virulent and slightly toxic bacterium a definite local cuti-immunity which is entirely absent with a highly invasive microbe may be demonstrated.

*Experiment 3* illustrates this statement. The same "antivirus" which served in experiment 2 and the same general procedure of experimentation was chosen with exception that young guinea-pigs and a strain of *B. aertrycke* of highest virulence and toxicity was used for the test inoculations. No attempts at subcutaneous immunization were made as the preceding experiment indicated conclusively that the protection was limited to the area of the skin treated with antivirus. Although every animal succumbed to the test inoculation it was observed that those treated with filtrates lived 3 to 5 days longer than the controls. Furthermore, it was noted that the test inoculation provoked insignificant local reactions. These observations have been repeatedly confirmed with other bacteria in young guinea-pigs and it is believed that they belong in the same category as those described by Zinsser and Grinnell<sup>8</sup> in connection with their studies on pneumococcus allergy. The apparent insensitiveness of young guinea-pigs (250 gm. and less) to various bacterial products in all probability plays not only an important rôle in allergy but also in the mechanism of cutaneous immunization and deserves further investigation.

In a fourth series it was conclusively proven that the intracutaneous injection of filtrates, heat killed or formalin-treated vaccines protected guinea-pigs not only against a fatal intracutaneous test inoculation but also against an oral infection provided at least 8-10 days elapsed between the treatment and infection. Agglutinins and other antibodies were always present in the blood. In fact, comparative experiments indicate that the intracutaneous method of immunization although the "susceptible organs" are not vaccinated, confers a much more effective protection to guinea-pigs against an oral infection with *B. aertrycke* than the subcutaneous or intraperitoneal application of antigens. The immunization is obviously general and not local. Since the last series of experiments confirmed similar studies by Reiter and Kurokawa,<sup>9</sup> Hartoch, Muratowa, Joffe and Berman,<sup>10</sup> Lumière and Chevrotier<sup>11</sup> and

8. J. Bact., 1927, 14, p. 301.

9. Klin. Wehnschr., 1926, 5, p. 744.

10. Centralbl. f. Bakteriöl., 1. O., 1924, 93, p. 528; also Hartoch and Joffe: Arb. a. d. Staats-Inst. f. exper. Therap. u. d. Georg Speyer-Hause, zu Frankfurt, Hft. 21, 1928, p. 83.

11. Comp. rend. Acad. d. sc., 1922, 174, p. 1080.



others it is now evident that the skin is a much more important organ in the process of immunization against paratyphoid infections or rodents. Furthermore, in the light of the experiments here detailed the conclusions that the skin possesses special immunologic properties appear justified. Although the functions of the skin as an immunity producing organ have not been studied in detail, it is already evident that the integumentum not only offers mechanical protection but also actively participates in the struggle of the body against bacteria. Viewed from this point of view the principle of cuti-immunization of Besredka assumes a new aspect.<sup>12</sup> In future communications the rôle of the skin in the immunity mechanism will be discussed.

#### CONCLUSIONS

The intracutaneous injections of sterile antiviral containing specific filtrates may protect guinea-pigs within 24 hours against a fatal intracutaneous injection of highly toxic *B. aertrycke* in the same area. Some protection may be secured by subcutaneous injection of antiviral provided the massive infective dose is introduced not sooner than 45 to 72 hours after treatment. Similar experiments with Friedlander's bacillus and *Vibrio septique*, *Cl. chauvoei* gave negative results.

Guinea-pigs are protected on the 8th to 10th day after intracutaneous injections with specific filtrates or vaccines against subcutaneous or oral infections. These experiments indicate that the skin possesses special immune biologic properties for bacteria.

12. Zinn and Katz: *Tuberkulose Bibliothek*, no. 27, 1927.

Reprinted from

THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, Vol. 44, No. 6, June, 1929, pp. 481-488

## VIRULENCE OF *B. PARATYPHOSUS* B (AERTRYCKE) IN GUINEA-PIGS

R. D. FRIEDLANDER AND L. D. HERTERT

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco, California*

Although relatively small numbers of organisms of the paratyphosus B group produce fatal infections in mice, it is exceedingly difficult to produce a fatal infection with this group in guinea-pigs by feeding. As a striking example of this fact, Petrie and O'Brien<sup>1</sup> cite a case in which each of 11 guinea-pigs were fed as much as 60 cc. of a 24-hour broth culture of *B. suis* and all survived. Smaller doses were ineffective in killing the guinea-pigs.

Although the organism used in these experiments was originally isolated from a guinea-pig, its virulence was lower for these animals than for white mice. This fact was borne out in previous experiments with the microbe in this laboratory. However, the possibility existed since the virulence could not be raised for white mice, that it might be possible to increase it for guinea-pigs, for which the organisms were practically harmless. Therefore, the following experiments were performed:

*Exper. 1.*—Before an attempt was made to increase the virulence of the *B. aertrycke* strain, it was decided to determine what effect the unpassed culture would have, when fed to guinea-pigs. This was done in the following manner:

Twenty-four guinea-pigs, weighing 500 grams and including four controls were bled from the ear, and agglutination tests were done with the serum obtained therefrom by the Gates'<sup>2</sup> method. The dilutions were 1:20, 1:40 and 1:80. All the animals showed negative tests for agglutinins against the strain of *B. aertrycke*. Twenty of the guinea-pigs were fed 5 cc. of an 18-hour hormone broth culture containing approximately 1 billion organisms per cc. Four guinea-pigs were not fed and were reserved as controls. At regular intervals of 24, 48 hours, 4, 6, 8, 10, 12, 16, 20 and 24 days two guinea-pigs were killed and a complete necropsy performed. Before being killed each animal was bled by cardiac puncture and the serum tested for agglutinins.

The following organs or their contents were streaked directly on Teague's medium and also enriched in gentian-violet brilliant-green enrichment broth: heart-

Received for publication, March 12, 1929.

1. J. Hyg., 1910, 10, p. 1287.

2. Rockefeller Inst. M. Res., 1922, 42, p. 69.

blood, lung, liver, gallbladder, spleen, kidney, bone marrow, mesenteric lymph nodes, stomach, duodenum, jejunum, ileum and colon. When colonies failed to appear from the direct smears on the plates, the enrichment broth cultures were streaked. All cultures were incubated at 37 C. for 24 hours and all colonies verified by slide agglutination tests with specific *B. aertrycke* antiserum.

Results: An examination of table 1 will show that the mortality was very low following the feeding of this strain, but the infectivity was rather high, 90%.

Pregnant guinea-pigs were the only ones fatally infected. Nelson and Smith<sup>3</sup> have recorded the fact that females show a greater susceptibility to infection with organisms of the paratyphoid group than males. A fair percentage were intestinal carriers—70%. None of the infected guinea-pigs showed positive agglutination tests at any time.

TABLE 1.—FEEDING EXPERIMENT 1 WITH GUINEA-PIGS

Organ	Number on Plating	Positive on Enrich- ment	Number Negative from Broth	Infection %
Stomach .....	2	0	18	10*
Duodenum .....	4	6	10	50
Jejunum .....	8	1	11	45
Ileum .....	10	2	8	60
Colon .....	8	6	6	70
Mesenteric lymph nodes...	12	1	7	65
Liver .....	7	9	4	80
Spleen .....	11	5	4	80
Gallbladder .....	3	1	16	20
Kidney .....	6	2	12	40
Heart blood.....	2	0	18	10*
Lungs .....	5	5	10	50
Bone marrow.....	2	0	18	10*

\* Both dead guinea-pigs.

Note.—Total infection 90%; agglutinins negative; controls negative for *B. aertrycke*; mortality 20%.

*Exper. 2.*—The previous experiment showed the lethal properties of the strain of *B. aertrycke* to be low, therefore, an attempt was made to raise the virulence by frequent subcultures in rough anti-serum broth. Immunization was started on a series of rabbits using rough type *B. aertrycke* antigen as a vaccine, with the following procedure. The animals received 5 injections intravenously of a formalinized vaccine standardized by Hopkins' method to contain 8 billion organisms per cc., the doses and intervals were: 1 cc. on the 1st day; 1 cc. on the 3rd day; 1 cc. on the 5th day; 2 cc. on the 7th day; 2 cc. on the 9th day; 10 million living organisms on the 11th day subcutaneously; 50 million living organisms on the 13th day subcutaneously.

The rabbit serums were titered and bled on the 18th day, the titer being 1:20,000.

A medium for subculture was prepared by adding 10% of the "rough" immune serum to a base of glucose veal broth,  $P_H$  6.5. The organism was subcultured in this medium every day for 25 days at which time it was fed.

It was noticed during passage that the organisms were clumped and many were killed, therefore, the bactericidal properties of the serum were determined. Tubes containing 2.5 cc. of medium plus serum dilutions were inoculated with 0.5 cc. of a 12-hour glucose veal broth culture of *B. aertrycke* and incubated for 3 hours at 37 C. At the end of 3-hours incubation, the tubes were all plated in triplicate, the plates incubated for 24 hours and then counted. The average results were as follows:

Control A plated immediately.....	104.0 million
Serum dilutions plated after 3 hours:	
1:5 .....	31.6 million
1:10 .....	34.3 million
1:10 with dextrin.....	34.3 million
1:20 .....	49.3 million
Control B plated after 3 hours.....	585.0 million

This test illustrated quite conclusively the bactericidal effect of the serum and also that the dextrin failed to prevent clumping.

The organism was subcultured 25 times in the 10% rough antiserum broth; the last transplant was made in 60 cc. of the same broth, previously heated for 1 hour at 52 C. to destroy the complement. This was done in order to eliminate the bactericidal effect of the serum since this property considerably decreased the number of organisms per cc. of culture.

Ten guinea-pigs and two controls, weight 500 grams, having been previously tested for agglutinins by the Gates' method and found negative, were fed 5 cc. by mouth of the passed culture. Each animal received 2.65 billion organisms as determined by plating. Stool cultures were taken on the following days: 3rd, 4th, 7th, 9th, 13th, 16th, 19th and 22nd days; at the end of which time the animals were killed. Stools were taken in brilliant-green gentian-violet broth, incubated, and plated on Teague's medium (brilliant-green eosin-agar). Colonies were identified by slide agglutination tests. All organs were cultured as described in the previous experiment.

Agglutination tests were performed with the serum of each animal on the 19th and 22nd days after infection.



Results: All agglutination tests were negative. Stool cultures were as follows:

Day .....	3	4	7	9	13	16	19	22
Positive, %....	10	10	20	0	0	20	0	10

The % of infections were as follows: stomach, 10; colon, 10; liver, 50; and spleen, 20. Duodenum, ileum, jejunum, mesenteric lymph nodes, gallbladder, heart blood, lungs and bone marrow were sterile. The total infection was 70%, no deaths; the 2 controls were negative. The average gain in weight for each animal during the course of the experiment was 125 grams.

*Exper. 3.*—The preliminary part of this experiment is identical with that of experiment 9 (part 1) previously recorded in that the 37th passage in rough type antiserum broth was fed to guinea-pigs as well as mice.

Fourteen guinea-pigs, including 7 controls were bled for homologous agglutinins preliminary to feeding and all tests were found negative by the Gates' method. The average weight of the guinea-pigs was 500 grams. Stool cultures were taken previously to feeding and on the 5th and 10th days after feeding and at death. Seven guinea-pigs were fed 5 cc. of an 18 hour-broth culture containing 10% rough type antiserum; each guinea-pig received 14.5 billion organisms.

A similar series were fed 5 cc. of the 37th passage in 10% rough antiserum hormone broth from the machine. Each guinea-pig received 2.5 billion organisms. The number of organisms in each case was determined by plate count; the discrepancy in dosage was unavoidable.

All animals were killed on the 20th day; the organs being plated directly on Teague's medium and enriched in gentian-violet brilliant-green broth. If no growth was apparent on the plates after incubation, the enrichment cultures were plated. All colonies were agglutinated with specific B. aertrycke antiserum.

Results: All agglutination tests were negative including those taken 10 days after feeding and at death, probably because sensitized antigens fail to stimulate agglutinins. The stool cultures were as follows:

	% Positive	
	Control	37th Passage
Before feeding.....	0.0 per cent	0.0 per cent
5th day.....	57.3 per cent	43.0 per cent
10th day.....	43.0 per cent	28.6 per cent
20th day.....	57.3 per cent	57.3 per cent

The total infection and mortality was: 37th passage guinea-pigs, 85.7% infected; control guinea-pigs, 100.0% infected; 37th passage guinea-pigs, 0.0% mortality; control guinea-pigs, 14.3% mortality. The average gain in weight among the passage guinea-pigs was 28.6 grams

and for the control guinea-pigs 7.1 grams. The percentage recovery of organisms was as follows:

Organ	37th Passage %	Control %	Organ	37th Passage %	Control %
Stomach .....	0.0	14.3	Gallbladder .....	14.3	14.3
Duodenum .....	0.0	14.3	Spleen .....	71.3	85.9
Jejunum .....	0.0	14.3	Kidney .....	43.0	14.3
Ileum .....	0.0	43.0	Bone marrow.....	14.3	14.3
Colon .....	57.3	57.3	Heart blood.....	0.0	14.3*
Mesenteric lymph nodes	28.6	71.3	Lungs .....	0.0	28.6*
Liver .....	43.0	100.0			

\* Death.

The comparison of plated and enriched cultures was as follows:

Organ	37th Passage		Control	
	Plated %	Enriched %	Plated %	Enriched %
Stomach .....	0.0	0.0	14.3	0.0
Duodenum .....	0.0	0.0	14.3	0.0
Jejunum .....	0.0	0.0	14.3	0.0
Ileum .....	0.0	0.0	14.3	0.0
Colon .....	0.0	57.3	43.0	0.0
Mesenteric lymph-nodes.....	14.3	14.3	28.6	28.6
Liver .....	14.3	28.6	28.6	72.3
Gall-bladder .....	0.0	14.3	14.3	0.0
Spleen .....	14.3	57.3	28.6	57.3
Kidney .....	14.3	28.6	14.3	0.0
Bone-marrow .....	14.3	0.0	14.3	0.0
Heart-blood .....	0.0	0.0	14.3	0.0
Lungs .....	0.0	0.0	14.3	14.3

The tabulation illustrates well how positive cultures may be missed by the method of direct plating, thus necessitating the taking of enrichment cultures as well. It also indicates relatively the number of organisms present in the respective organs, since if many are present, they will be recognized by direct plating, whereas only a few are liable to be overlooked and appear only after enrichment.

*Exper. 4.*—The guinea-pigs in this experiment were fed the same culture as the mice in experiment 8 (pt. 1.), namely the 89th passage in plain hormone broth from the automatic transferring device.

Fourteen guinea-pigs, having an average weight of 500 grams were tested for agglutinins by the Gates' method and for positive stool cultures preliminary to feeding. Both were found to be negative. Seven of the animals were fed 5 cc. of an 18-hour hormone broth culture as controls; each guinea-pig receiving 124 billion organisms determined by plate count. A similar series were fed the 89th passage, each animal receiving 163 billion organisms. Stool cultures and agglutinins were taken in the same manner as in experiment 3. The animals were killed on the 20th day after feeding and their organs treated as previously stated in experiment 3.

Results: All agglutination tests were negative. The stool cultures were as follows:

	% Positive	
	Control	89th Passage
Before feeding.....	0.0	0.0
5th day.....	100.0	100.0
10th day.....	100.0	85.7
20th day.....	28.5	50.0

there was 100% infection in both passage and control animals and one animal in the control group succumbed to a typical infection 14 days later. The average weight loss among the passage animals was 50 grams, while the control guinea-pigs gained an average of 25 grams. The % recovery of organisms was as follows:

Organ	89th Passage	Control	Organ	89th Passage	Control
Stomach .....	16.6	28.6	Gall-bladder .....	16.6	14.3
Duodenum .....	66.6	42.9	Spleen .....	66.6	57.2
Jejunum .....	66.6	42.9	Kidney .....	50.0	28.6
Ileum .....	32.2	28.6	Bone-marrow .....	0.0	14.3
Colon .....	66.6	42.9	Heart-blood .....	0.0	14.3*
Mesenteric lymph-nodes	83.2	100.0	Lungs .....	50.0	42.9
Liver .....	66.6	85.8			

\* Death.

The comparison of plated and enriched cultures was as follows:

Organ	Control		89th Passage	
	Plated	Enriched	Plated	Enriched
	%	%	%	%
Stomach .....	14.3	14.3	0.0	16.6
Duodenum .....	42.9	0.0	33.3	33.3
Jejunum .....	42.9	0.0	50.0	16.6
Ileum .....	28.6	0.0	33.3	0.0
Colon .....	28.6	14.3	50.0	16.6
Mesenteric lymph-nodes....	57.2	42.9	50.0	33.3
Liver .....	42.9	42.9	33.3	33.3
Gallbladder .....	14.3	0.0	16.6	0.0
Spleen .....	57.2	0.0	33.3	33.3
Kidney .....	28.6	0.0	33.3	16.6
Bone-marrow .....	14.3	0.0	0.0	0.0
Heart-blood .....	14.3	0.0	0.0	0.0
Lungs .....	28.6	14.3	33.2	16.6

#### SUMMARY AND DISCUSSION

Guinea-pigs are refractory to infections with an aertrycke strain unless massive doses are fed. This finding is well in accordance with the literature. The virulence of the organism, from the standpoint of fatal infection, could not be increased by any of the measures resorted to. According to Smith and Tibbetts,<sup>4</sup> the capacity to produce disease

4. J. Exper. Med., 1927, 45, p. 337.

among highly parasitic types of the paratyphoid group consists in the power to penetrate the mucosa, to lodge and to multiply in certain viscera, chiefly the spleen, lymphoid tissue of the intestines and liver, in which a toxin comes into contact with certain vulnerable cells. It appears that with guinea-pigs massive numbers of organisms are necessary to produce such a sequence of events. Furthermore, the spontaneous disease is probably the result of an invasion of the viscera from the digestive tract following feeding, but the relation between the dose fed and the numbers penetrating the mucosa is a variable one and the conditions favoring such invasion have not as yet been determined. This is indeed a logical surmise, but in the experiments here reported "silent infections" were produced which could not be evidenced by the presence of agglutinins or positive stool cultures.

The fact that experiment 4, in which the guinea-pigs were fed over 100 billion organisms, was the only one in which the stool cultures were positive in a 100% of the tests, illustrates the thought that resistance to infection may be overcome by massive doses. Even in this case, however, only one animal died from active disease, the others remained apparently healthy. Examination of the tables of experiment 4 will show that the clinically healthy animals were, however, infected. The blood serum failed to agglutinate the infective microorganism irrespective of the fact that the strain of *B. aertrycke* employed in the experiments was not inagglutinable. On intracutaneous injection the same strain incited the production of specific agglutinins (Averill and Meyer<sup>5</sup>).

It is difficult to explain the absence of agglutinins in the animals infected by feeding on any other basis than that guinea-pigs offer an unfavorable environment for the existence of this organism. Eastwood<sup>6</sup> presents the acceptable view that virulence and antibody formation go hand in hand. He considers virulence to be dependent on the interaction between bacterium and host and that the difference between a virulent and nonvirulent strain is that the former interacts with its animal host in such a way as to produce an environment favorable for bacterial growth within the tissues, whereas the latter fails to do so. The products of interaction between bacterium and host are antigenic and an increase or diminution of virulence are associated with an increase or a diminution in capacity to form these antigenic products. It is only logical to conclude, therefore, that this explanation may

5. *J. Infect. Dis.*, 1929, 44, p. 495.

6. Reports Pub. Health and Med., Subject 22, Ministry of Health, London, 1923.



account for the absense of agglutinins and that the organism was practically avirulent for the guinea-pigs both before and after passage. Further experiments to elucidate this important observation which may stand in some relation to the H- and O-agglutination<sup>7</sup> are now in progress.

#### CONCLUSIONS

It was impracticable to increase the virulence of a strain of *B. aertrycke* for guinea-pigs after passage in plain hormone broth at 6-hour intervals or in rough antiserum broth at 6 or 24 hour intervals.

The inability to raise the virulence of *B. aertrycke* for guinea-pigs is explained by the fact that these animals offer an unfavorable environment for the growth of this organism as evidenced by the absence of antibody response.

7. Felix, A.: *J. Immunol.*, 1924, 9, p. 115; Olitzki, L.: *Centralbl. f. Bakteriol., E, O.*, 1928, 106, pp. 247, 267; *J. Hyg.*, 1928, 28, p. 55.

## VIRULENCE OF *B. PARATYPHOSUS* B (AERTRYCKE) IN WHITE MICE

R. D. FRIEDLANDER AND K. F. MEYER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco, California*

Although a great deal of work has been done on the virulence of different microorganisms, there are at present, a variety of opinions concerning the possibility of enhancing it either by passage in vitro or through animals. There is no doubt that some workers have conclusively demonstrated the ability to increase virulence by animal passage, but the accomplishment of this phenomenon by rapid cultivation in vitro may still be questioned.

Regardless of the fact that this paper has little to do with virulence in relation to animal passage, it seems only necessary that a brief resume be given of what has been done along this line. In order to approach an orderly arrangement, the literature has been divided into two main groups: that concerned with increase and decrease in virulence by animal passage; and that concerned with increase and decrease in virulence by passage in vitro.

In 1891, Kruse and Pansini<sup>1</sup> practically opened the field with the report that they were able to increase the virulence of pneumococci by passage through gray mice and rabbits, whereas their cultures on agar and gelatin quickly lost their lethal properties. Not long after this Eyre and Washbourn,<sup>2</sup> also working with pneumococci, found that they were also able to increase the virulence of avirulent cultures by passage through rabbits. This work was then repeated by Stryker,<sup>3</sup> who showed that pneumococci grown in immune serum became avirulent, but that these avirulent strains reverted to their original type by animal passage. Working with *Streptococcus pyogenes*, Gay<sup>4</sup> found that by means of frequent passage through the pleural cavity of rabbits, the virulence was enhanced, so that an intrapleural injection of the organism produced a fatal empyema, whereas previously the organism was harmless for rabbits, except in massive doses. Moreover, Dawson and Avery<sup>5</sup> have recently shown that it is possible to revert R strain pneumococci to the S type by means of mouse passage. Upon reversion, the organisms acquired all the properties of the S form, including virulence.

Working with an organism of the enteriditis group, Danysz<sup>6</sup> found as early as 1900, that he could increase the virulence of his strain by repeated passage in colodion sacs in the peritoneal cavity of rats, whereas no increase in virulence

Received for publication, March 12, 1929.

1. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1891, 11, p. 279.
2. J. Path. & Bacteriol., 1897, 4, p. 394.
3. J. Exper. Med., 1916, 24, p. 49.
4. J. Immunol., 1923, 8, p. 7.
5. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1927, 24, p. 943.
6. Ann. de l'Inst. Pasteur, 1900, 14, p. 193.

occurred after passage in bouillon or gelatin. Webster<sup>7</sup> looked at the situation from a different angle. He increased the susceptibility of mice to mouse typhoid by sensitization with ox-bile, instead of attempting to alter the characteristics of his organism and thereby slightly raised the death rate and shortened somewhat the duration of life of susceptible animals. On the other hand Lockhart<sup>8</sup> found that the virulence of a single strain of *B. aertrycke* could be significantly increased as a result of animal passage.

If the idea has been conveyed that virulence may be positively increased by animal passage, some of the studies rewarded by negative findings should be mentioned. Webster<sup>9</sup> devised experiments to determine if direct passage from mouse to mouse without intermediate cultivation on medium would increase virulence. He found that neither intraperitoneal nor oral passage increased or lowered the virulence, but he did find that his culture of mouse typhoid II could be kept at approximately constant infecting levels if passed through mice by mouth at frequent intervals. About the same time, Nichols and Stimmel,<sup>10</sup> also working with a paratyphoid organism, reported that they could maintain the virulence of *B. aertrycke* at a fairly fixed point by making blood cultures from sick animals and then transplanting to blood broth. Heim,<sup>11</sup> however, found many years previously that he could accomplish the same thing by preserving his mouse typhoid bacillus in desiccated spleens. Savage and White<sup>12</sup> reported in their paper on food poisoning that passage of a paratyphoid B organism through mice resulted in no enhancing of the virulence, and Tibbetts and Smith,<sup>13</sup> also interested in paratyphoid infections reported negative findings. Besredka<sup>14</sup> was fairly successful in increasing the virulence by 15 passages through rabbits, but it was necessary to repeat this procedure quite often in order to prevent the culture (paratyphoid B) from returning to its original low infective titer.

To return to pneumococci, Reiman<sup>15</sup> found no increase whatever in the infective properties of an avirulent culture after it had been passed through 105 mice (normal), 10 mice intoxicated with alcohol, and passed through broth numerous times. Falk and Jacobson,<sup>16</sup> in their studies on electrophoresis, met with similar results; passage through mice had no effect whatever on their rough strains of pneumococci. Only quite recently Burgess,<sup>17</sup> interested in plague studies found that his strain suffered a marked fall in virulence when subjected to passage through vaccinated animals and attempts to restore its former properties by animal passage failed. With regard to passage in vitro, Roger<sup>18</sup> found, as early as 1890, that the virulence of streptococci diminished progressively during repeated transfers in broth and that it could be again restored by serial transplants in normal rabbit serum. In 1906 Trautmann<sup>19</sup> noticed that a rat strain of *B. enteritidis* lost its virulence after isolation. He had little success in increasing this property by animal passage and in various suitable mediums. His line of reasoning was as follows: since his strain was identical with *B. enteritidis* and the latter attained

7. J. Exper. Med., 1923, 37, p. 33.

8. J. Hyg., 1926, 25, p. 50.

9. J. Exper. Med., 1923, 38, p. 33.

10. Ibid., 1923, 33, p. 283.

11. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1905, 50, p. 123.

12. Medical Research Council, Spec. rep. 91, 1925, p. 112.

13. J. Exper. Med., 1927, 45, p. 337.

14. Local Immunity, 1927.

15. J. Exper. Med., 1925, 41, p. 587.

16. J. Bact., 1927, 13, p. 191.

17. J. Hyg., 1927, 26, p. 152.

18. Compt. rend. Soc. de biol., 1890 (q. s. 2), p. 573.

19. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1906, 59, p. 104.

high pathogenicity in beef, he tried passage in sterile beef broth three times daily for 12 days. As a result, the organism then killed some rats, whereas previously it was harmless. Subcultures on pigeon blood agar 7 to 12 times daily also proved favorable in enhancing the virulence.

Working along a different line, Wadsworth and Kirkbride<sup>20</sup> discovered that they were able to produce an increase in virulence of pneumococci during rapid cultivation at intervals of 8 hours in plain broth. On the contrary, however, there was a decided reduction during cultivation in the same medium by repeated transfers at 24-hour intervals. It was shown that the presence of blood, serum, or other tissue fluid was not essential to maintain the virulence, that this could be preserved by rapid cultivation. These results were corroborated by Felton and Dougherty<sup>21</sup> with the aid of an automatic transferring device, so arranged that the culture of pneumococci could be maintained in a growth receptacle, that latter was then flushed at any interval desired by a siphoning apparatus, controlled by an electromagnetic release. With this device they were able to increase the virulence of an avirulent strain 10-million fold, when passed in milk at 4-hour intervals. They found, however, that the  $P_H$  and composition of the medium were quite as important as the interval of transfer.

Injection of mice with decreasing dilutions of streptococcus cultures of different ages, Bloomfield and Felty<sup>22</sup> found that the pathogenicity of the organisms was much lower in the stage of decline than in the stage of active growth. With the stage of decline there appeared not a gradual, but an abrupt falling off of virulence, although a high and constant level was maintained during the interval of transfer.

In 1926 Jordan<sup>23</sup> reported that it was possible to convert R organisms of the paratyphosus B type to S strains by growing them in veal infusion broth, subculturing twice a day for 36 days. Moreover, Dawson and Avery<sup>6</sup> report that they were able to convert K type pneumococci cultures to S forms by growing them in broth to which the serum of rabbits immunized to R forms was added. Rapid passage in vitro, however, has not proven to be an infallible method for enhancing virulence. Von Lingelsheim<sup>24</sup> in 1890 could not increase the virulence of streptococcus pyogenes by successive serum transfers.

Interested in diphtheria, Williams<sup>25</sup> attempted to enhance the virulence of some of his avirulent strains of diphtheria bacilli by growing them in symbiosis with virulent streptococci in broth for 90 culture generations, transplanted every 3 to 4 days, but when these organisms were separated, no change in virulence was noted. Attempts to increase the virulence by peritoneal passage also proved futile.

In order to determine the effect of passage in vitro on his bacillus of rabbit septicemia, De Kruif<sup>26</sup> reported that the virulent D strain after 25 daily passages in serum broth and in plain broth showed no change in virulence and retained perfectly its former characteristics. The avirulent G type likewise remained unchanged after 25 daily passages in serum broth.

In 1921 Harvey and Iyengar<sup>27</sup> reported that they were able to maintain the virulence of a strain of *B. avisepticus* by serial transplantation on blood agar, whereas subculturing weekly on ordinary agar resulted in a considerable decrease

20. J. Exper. Med., 1928, 28, p. 791.

21. J. Exper. Med., 1924, 39, p. 137.

22. J. Exper. Med., 1924, 40, p. 703.

23. J. Am. M. A., 1926, 86, p. 177.

24. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1891, 10, p. 356.

25. J. M. Res., 1902, 8, p. 83.

26. J. Exper. Med., 1921, 33, p. 773.

27. Indian J. M. Res., 1921-1922, 9, p. 726.



in virulence. In a later publication, Iyengar<sup>28</sup> stated that by daily subcultures of the same organism for 14 days on rabbit blood agar, it was found impossible to raise the virulence, although the latter was maintained. He showed that the virulence of the organism could be increased by several passages through pigeons.

Wilson<sup>29</sup> in 1926 tried to repeated the work of Bloomfield and Felty<sup>22</sup> working with *B. aertrycke*. However, he was unable to confirm their results and concluded from injecting mice with organisms from various stages of the growth cycle that there was no difference in the virulence of his organism detectable during the first week of growth.

In an interesting paper Todd<sup>30</sup> reports that cultivation on agar caused a rapid fall in the power of streptococci to multiply in human blood, hence a decrease in virulence for mice, but that these lost characteristics could be restored by cultivation in normal human serum. However, after more prolonged cultivation on agar, the cocci passed into a state in which the cultivation in serum would not restore the power to multiply in blood.

#### PRELIMINARY EXPERIMENTS

Since the principles of the problem were based on the idea that an organism rapidly subcultured during its logarithmic growth phase might increase in virulence, it was first necessary to determine the time period of this phase for the strain of *B. aertrycke*, which we intended to use in our experiments. Several growth curve charts were prepared and it was found that this strain exhibited a logarithmic growth period, as defined by Chesney<sup>31</sup> and Buchanan<sup>32</sup> of 8 to 9 hours and a generation time of 27.5 minutes, as determined by the method of Lane-Clayton,<sup>33</sup> using the formula of Buchner, Longard and Riedlin.

The apparatus used in the following experiments was arranged by W. M. Weiner<sup>34</sup> and modified to suit our needs. Growth curves prepared of the organism while in this transferring device indicated a wide variation in count during the different passages, although the number of organisms in the apparatus after each flushing did not fall considerably below  $\frac{1}{2}$  or  $\frac{1}{3}$  of the number before flushing.

#### FEEDING EXPERIMENTS WITH WHITE MICE

*Exper. 1.*—The automatic transferring apparatus was set up and its sterility controlled. The solenoid was so arranged that the medium was allowed to flow through the growth chamber for 10 seconds every

28. *Ibid.*, 1925-1926, 13, p. 555.

29. *J. Hyg.*, 1926, 25, p. 142.

30. *Brit. J. Exper. Path.*, 1927, 8, p. 289.

31. *J. Exper. Med.*, 1916, 24, p. 387.

32. *J. Infect. Dis.*, 1918, 23, p. 109.

33. *J. Hyg.*, 1909, 9, p. 239.

34. *J. Infect. Dis.*, 1927, 41, p. 276. In this communication on account of an oversight no credit was given to the many suggestions which were given to the junior author by L. D. Felton of Harvard Medical School. Any modifications made by Weiner in the apparatus used by Felton and Dougherty are minor in character. The fundamental principles have been developed by these two workers; they deserve all the credit.

3 hours thus completely flushing it. The medium used was hormone broth with a final  $P_H$  of 7.1 to 7.2. The device was then inoculated with 1 cc. of a 3-hour hormone broth culture of *B. aertrycke*. In this experiment only one passage was fed, namely, the 29th. Six dilutions, however, were fed from this passage and control; the latter being an 18-hour hormone broth culture. The average weight of the mice used was 21 gm. and the maximum number of mice per cage was 4. All mice were fed with an 18-gauge silver catheter stomach tube (Webster<sup>9</sup>) the volume administered did not exceed 0.2 cc. The following illustrates the number of mice and the dosage for both the control and passed cultures:

CONTROL	
Number of Mice	Number of Organisms
8.....	0.2 cc. original; 200 million
7.....	0.2 cc. 1:10; 20 million
7.....	0.2 cc. 1:100; 2 million
7.....	0.2 cc. 1:1,000; 200,000
7.....	0.2 cc. 1:10,000; 20,000
7.....	0.2 cc. 1:100,000; 2,000

Note.—The above dosages were based on the fact that 1 cc. of 18-hour hormone broth culture contained 1 billion organisms per cc., as determined from previous growth curves.

29TH PASSAGE	
Number of Mice	Number of Organisms
10.....	0.2 cc. original; 800 million
9.....	0.2 cc. 1:10; 80 million
10.....	0.2 cc. 1:100; 8 million
10.....	0.2 cc. 1:1,000; 800 thousand
9.....	0.2 cc. 1:10,000; 80 thousand
10.....	0.2 cc. 1:100,000; 8 thousand

Note.—The discrepancy between the number of organisms fed from the control and passed cultures was due to the fact that it was not known at the time that the number of organisms present in the growth chamber of the machine would exceed 1 billion per cc. Fortunately the results of this experiment were not disqualified by this error as will be shown later.

Technique: A limit of 15 days was set at which time all mice not dead were killed and necropsies were made. All mice were thus examined and cultures taken from all organs, by smearing the latter on Teague's medium and picking colonies therefrom. All colonies were identified by slide agglutination tests with a specific antiserum. This technique has been carried out in all feeding experiments on mice.

Results: In evaluating the results of this experiment and of those to follow, several criteria have been used in order to determine whether or not an increase in virulence\* has occurred. They are: mortality; average survival time of those mice succumbing to infections or the period elapsing between feeding and death; percentage infection of all mice fed, and the severity of infection in the mice, or distribution of the organism in the host.

\* The term virulence, as used in this report, does not mean only the power of a parasite to multiply within the tissues of the host, but also the power to penetrate the tissues of that host by its own ability (Topley).<sup>35</sup>

35. J. Hyg., 1923, 21, p. 3; Lancet, 1919, 2, p. 1.

With these criteria in mind, examination of table 1 shows: The mortality among the mice fed the control dilutions was greater than in the 29th passage dilutions (in the higher dosages), although the number of organisms fed in the latter was slightly greater. The period which elapsed between feeding and death varied considerably, but was slightly shorter in these mice receiving the 29th passage. This may have been due to the slightly higher dosage. The total infection was practically the same for both cultures. The distribution of the organism was slightly greater in the mice fed the control cultures, both among the fatally infected and surviving mice.

TABLE 1.—FEEDING EXPERIMENT 1: WHITE MICE, 3-HOUR INTERVAL				
COMPARISONS OF % MORTALITY, AND OF AVERAGE SURVIVAL TIME				
Dilution	% Mortality		Days from Feeding to Death	
	Control	29th	Control	29th
Original.....	75	80	4	6.3
1:10.....	100	77	5.1	3.7
1:100.....	100	70	7.4	6.1
1:1,000.....	42.8	40	4.6	5.5
1:10,000.....	14.7	44	10	6.6
1:100,000.....	0	20	15 (none died)	10.0
COMPARISON OF % INFECTED OF TOTAL NUMBER OF MICE				
	Control	29th		
	97.6	95		
COMPARISON OF % DISTRIBUTION AMONG ORGANS				
	Of Mice Dying from Infection		Of Mice Surviving Infection	
	Control	29th	Control	29th
Liver.....	95.8	90.6	84.2	72
Spleen.....	91.6	100.0	94.7	88.4
Heart blood.....	95.8	84.3	26.3	15.4
Lung.....	91.6	87.5	68.4	50.0
Kidney.....	83.3	93.8	21.0	26.9
Stomach.....	95.8	84.3	26.3	11.5
Intestine.....	91.6	75.0	42.2	15.4
Bone marrow.....	(not taken)	100.0	(not taken)	11.5

*Expers. 2, 3 and 4.*—These experiments were designed to check the previous one and to determine whether further subculturing might enhance the virulence.

The automatic transferring device was set up in a manner identical with that of the previous experiment, using hormone broth, subculturing at a 3-hour interval. The average weight of the mice was 21 grams and the maximum number per cage was 4. All mice were fed 0.2 cc. with an 18-gauge silver catheter stomach tube.

Several innovations were made in these experiments. Due to the fact that the mortality in the lower dilutions was so great, it was thought that feeding the higher dilutions, i. e., 1:10,000 and 1:100,000 would produce a more striking comparison, were the virulence increased. Moreover, to overcome the difficulty of feeding comparable doses to

the control and passage mice, both control and passed cultures were standardized in Hopkin's tubes by centrifugalizing for  $\frac{1}{2}$  hour at high speed, then calculating from the amount of bacteria in the calibrated portion of the tube, after resuspending in 5 cc. of sterile salt solution.

The technique employed was identical with that in the previous experiment. The following table shows the number of mice and the standardized doses for both control and passed cultures:

Number of Mice		Number of Organisms	
Control	10.....	0.2 cc. of 1: 10,000;	64,000
	10.....	0.2 cc. of 1: 100,000;	6,400
29th passage.....	10.....	0.2 cc. of 1: 10,000;	64,000
	10.....	0.2 cc. of 1: 100,000;	6,400
53rd passage.....	10.....	0.2 cc. of 1: 10,000;	48,000
	10.....	0.2 cc. of 1: 100,000;	4,800
85th passage.....	8.....	0.2 cc. of 1: 10,000;	48,000
	8.....	0.2 cc. of 1: 100,000;	4,800

Results: Table 2 affords a comparison showing the mortality among the control mice to be greater than in any of the passages. The period elapsing between feeding and death among the mice fed the 53rd and 85th passages was shorter. A comparison of the total number of infected mice in each passage, shows the percentage to be about 35% higher among the control mice.

The severity of infection may be judged by comparing the percentage recovery of the organism from the various organs of mice both dead and sacrificed. A glance at table 2 shows that mice fatally

TABLE 2.—FEEDING EXPERIMENTS 2, 3 AND 4: WHITE MICE, 3-HOUR INTERVAL

COMPARISON OF % MORTALITY								
Dilution	Control	29th	53rd	85th				
1:10,000.....	40	10	10	12.5				
1:100,000.....	40	0	20	12.5				
COMPARISON OF AVERAGE SURVIVAL TIME: INTERVAL BETWEEN FEEDING AND DEATH								
Dilution	Control	29th	53rd	85th				
1:10,000	10 days	12 days	7 days	4 hours (injured)				
1:100,000	11 days	15 days (none died)	9 days	7 days				
COMPARISON OF % INFECTED OF TOTAL NUMBER OF MICE IN EACH PASSAGE								
Control	29th	53rd	85th					
95	65	60	62.5					
COMPARISON OF % DISTRIBUTION AMONG ORGANS								
	Of Mice Dying of Infection				Of Mice Surviving Infection			
	Control	29th	53rd	85th	Control	29th	53rd	85th
Liver.....	100	100	100	0	75	31.5	47.0	28.5
Spleen.....	100	0	100	0	66.6	42.1	41.1	57.1
Heart blood.....	100	0	33.3	50	0	15.7	0	0
Lung.....	100	100	33.3	0	16.6	15.7	5.8	21.0
Kidney.....	75	0	100	50	16.6	21.0	5.8	14.2
Stomach.....	62.5	100	33.3	50	25.0	21.0	11.7	7.1
Intestine.....	50	100	100	0	58.3	36.8	17.6	7.1
Bone marrow.....	87.5	0	33.3	0	8.3	15.7	0	14.2



infected with the control culture possessed the organism in a greater percentage of all the tissues than the mice receiving the passed cultures. The mice surviving the infection with the control culture were also more diffusely infected than those fed with the passages. It is obvious that in experiments 1, 2, 3 and 4 the virulence was not perceptibly increased.

*Exper. 5.*—Transfers at a 6-hour interval using the same medium were then decided upon, since at 6 hours the organisms are more nearly in the middle of the logarithmic growth phase.

The transferring device was set up the same as before, with the exception that the automatic clock was set to flush the growth chamber every 6 hours. The suspensions from a control culture, 18-hour hormone broth culture, and from the 27th passage were standardized in Hopkin's tubes as described previously and the following mice and dilutions were fed:

Number of Mice		Number of Organisms	
Control	..... { 10.....	0.2 cc. of 1: 10,000;	64,000
	..... { 10.....	0.2 cc. of 1: 100,000;	6,400
27th passage	..... { 10.....	0.2 cc. of 1: 10,000;	64,000
	..... { 10.....	0.2 cc. of 1: 100,000;	6,400

The technique was the same as that in experiments 1, 2, 3 and 4.

Results: Table 3 shows an increase in mortality of the mice fed the 27th passage over those fed the control. And as examination of the table will indicate, this was much more apparent in the 1:10,000

TABLE 3.—FEEDING EXPERIMENT 5: WHITE MICE, 6-HOUR INTERVAL

COMPARISON OF % MORTALITY				
Dilution		Control	27th	
1:10,000.....		22.2	70	
1:100,000.....		50.0	60	
COMPARISON OF AVERAGE INTERVAL BETWEEN FEEDING AND DEATH				
Dilution		Control	27th	
1:10,000.....		7.6 days	7.2 days	
1:100,000.....		11.2 days	8.5 days	
COMPARISON OF % OF TOTAL NUMBER OF MICE INFECTED				
		Control	27th	
		94.7%	95%	
COMPARISON OF % DISTRIBUTION AMONG ORGANS				
	Of Mice Dying from Infections		Of Mice Surviving Infections	
	Control	27th	Control	27th
Liver.....	100	100	66.6	42.8
Spleen.....	100	100	66.6	85.6
Heart blood.....	85.6	92.3	16.6	14.2
Lung.....	100	92.3	58.4	28.4
Kidney.....	100	100	41.6	14.2
Stomach.....	85.6	76.9	16.6	28.4
Intestine.....	100	100	50.0	14.2
Bone marrow.....	100	92.3	8.3	0

dilution than in the 1:100,000 dilution. The interval between feeding and death of the infected mice fed the 27th passage was shorter than that of the control in both dilutions. The total infection was practically the same for both control and passage mice. The distribution of the organism among the mice dying from infections was practically the same for both groups of mice, but the distribution among surviving mice was slightly greater among the control mice.

There are, then, indications that the virulence of the organism may have been slightly increased. Whether or not this increase falls outside of the range of experimental error is difficult to state on hand of the data thus far collected.

*Exper. 6.*—This experiment was designed to constitute a check on the previous tests and was carried out under the same conditions and with the same technique. Suspensions from a control culture and the 24th passage at 6 hour intervals were standardized in Hopkin's tubes as previously described and the following dilutions and mice were fed:

Number of Mice		Number of Organisms	
Control .....	9.....	0.2 cc. of 1: 10,000; 64,000	
	10.....	0.2 cc. of 1: 100,000; 6,400	
24th passage.....	8.....	0.2 cc. of 1: 10,000; 64,000	
	10.....	0.2 cc. of 1: 100,000; 6,400	

Results: In this experiment there was also an increase in mortality of the passed culture over the control, although not quite so great as in the previous experiment (table 4). The interval between feeding

TABLE 4.—FEEDING EXPERIMENT 6: WHITE MICE, 6-HOUR INTERVAL

COMPARISON OF % MORTALITY

Dilution	Control	24th
1:10,000.....	11	50
1:100,000.....	10	30

COMPARISON OF AVERAGE INTERVALS BETWEEN FEEDING AND DEATH

Dilution	Control	24th
1:10,000.....	8 days	10 days
1:100,000.....	8 days	6.6 days

COMPARISON OF % OF TOTAL NUMBER OF MICE INFECTED

Control	24th
73.6	72.2

COMPARISON OF % DISTRIBUTION AMONG ORGANS

	Of Mice Dying from Infection		Of Mice Surviving Infection	
	Control*	24th	Control	24th
Liver.....	100	85.7	64.7	45.4
Spleen.....	100	85.7	64.7	54.5
Heart blood.....	50	85.7	0	0
Lung.....	100	85.7	35.2	27.2
Kidney.....	50	85.7	23.5	0
Stomach.....	50	42.8	5.8	0
Intestine.....	50	57.1	11.8	9.0
Bone marrow.....	100	57.1	23.5	0

\* Only 2 mice died.

and death of the fatally infected mice was about the same for both groups, and this was also true for the total number of mice infected. The distribution among the organs of mice dying from infection was perceptibly greater in the mice fed the control culture, and the same was found to be true among the surviving mice.

This then corroborates the results of the previous experiment to some extent, but the results were not so striking.

*Expers. 7 and 8.*—Since the previous experiments seemed to indicate, that subculturing at 6-hour intervals might increase the virulence somewhat, it was deemed advisable to determine the effect of feeding further passages. Suspensions from an 18-hour culture, the 52nd and 89th passages were standardized in Hopkin's tubes and the following dilutions and mice were fed:

Number of Mice		Number of Organisms	
Control	..... { 8.....	0.2 cc. of 1: 1,000; 320,000	
	..... { 7.....	0.2 cc. of 1: 10,000; 32,000	
52nd passage	..... { 8.....	0.2 cc. of 1: 1,000; 320,000	
	..... { 7.....	0.2 cc. of 1: 10,000; 32,000	
89th passage	..... { 9.....	0.2 cc. of 1: 1,000; 320,000	
	..... { 9.....	0.2 cc. of 1: 10,000; 32,000	

Results: Table 5 shows considerable variation in the mortality, but there is no definite increase of the mortality among the passage over that of the control mice. The average time elapsing between feeding and death was about the same for the three groups of fatally infected ani-

TABLE 5.—FEEDING EXPERIMENTS 7 AND 8: WHITE MICE, 6-HOUR INTERVAL

## COMPARISON OF % MORTALITY

Dilution	Control	52nd	89th
1:1000.....	62.5	25	55.5
1:10,000.....	14.2	0	44.4

## COMPARISON OF AVERAGE INTERVAL BETWEEN FEEDING AND DEATH

Dilution	Control	52nd	89th
1:1000.....	6 days	13.5 days	12 days
1:10,000.....	13 days	15 days	11.5 days

## COMPARISON OF % OF TOTAL NUMBER OF MICE INFECTED

Control	52nd	89th
100	60	100

## COMPARISON OF % DISTRIBUTION AMONG ORGANS

	Of Mice Dying from Infection			Of Mice Surviving Infection		
	Control	52nd	89th	Control	52nd	89th
Liver.....	100	50	100	77.7	23	100
Spleen.....	100	100	100	77.7	53.8	100
Heart blood.....	100	50	100	33.3	0	11.1
Lung.....	83.3	50	88.8	33.3	7.6	77.7
Kidney.....	100	50	100	33.3	0	44.4
Stomach.....	66.6	50	66.6	0	7.6	22.2
Intestine.....	66.6	100	55.5	55.5	0	55.5
Bone marrow.....	100	100	100	11.1	7.6	11.1

mals, except that those mice receiving the 1:1000 dilution of the control culture succumbed in a shorter space of time. The total number of mice infected was the same for the control and the 89th passage, whereas, it was 40% lower in the 52nd passage. The distribution of the organism in the tissues of the dead mice was almost identical in the control and 89th passages, whereas in the 52nd passage, the figures were slightly lower. With regard to those mice surviving infection, it may be seen in table 5 that the 89th passage mice were more heavily infected than the control mice, and the control more than the 52nd passage mice.

In other words, then, no appreciable increased virulence was demonstrated in plain hormone broth at either the 3-hour or 6-hour interval of rapid transplanting in plain hormone broth (Huntoon).

*Exper. 9.*—As previously stated, Dawson and Avery<sup>5</sup> were able to revert pneumococcus type R cultures to S forms by growing them in broth to which the serum of rabbits immunized to R forms was added and Soule<sup>38</sup> working with *B. subtilis* reported the fact that immune serum possessed a marked dissociating power on its homologous germ, and a stabilizing action on the opposite form. He found that with the incorporation of S or R immune serums in fluid medium, R forms could be obtained from S forms and vice versa.

With such information in mind, a procedure was outlined wherein the above mentioned principles were carried out in the present series of experiments. Since, if by chance, it happened to be the R forms that might be holding back the virulence, the presence of a strong R type antiserum might influence these forms to change over to S types, at the same time stabilizing the action of the S forms already in the culture.

Twelve medium-sized young rabbits were immunized with a rough strain of *B. aertrycke* (Barber technique used for obtaining single cell culture) until a suitable agglutinating titer was attained. The rabbits were then exsanguinated by carotid bleeding under sterile conditions, the serum separated and pooled. The titer of the pooled serum was 1:10,000. In order to determine the bactericidal effect of this antiserum on the organism the following procedure was carried out:

Tubes were set up to the same volume containing: plain hormone broth, 2 control tubes; plain hormone broth + 10% normal rabbit serum, heated; plain hormone broth + 10% normal rabbit serum, unheated; plain hormone broth + 10% rough type antiserum, heated; plain hormone broth + 10% rough type antiserum unheated. The heated tubes were allowed to remain in a water bath for 1 hour at 56 C. to destroy the complement. After 24-hours' incubation at 37 C. as a test for sterility of the above mediums, each tube was inoculated with 0.5 cc. of a 3-hour broth culture of *B. aertrycke*.

One control tube was plated immediately; the other control tube, together with the serum broth tubes, was incubated for 3 hours at 37 C. and then plated; plates

38. J. Bact., 1927, 13, p. 41.



were made in triplicate with peptic digest agar, incubated for 24 hours at 37 C., and counted; new pipets were used for each dilution. The results of this experiment were as follows:

Medium	Organisms
Control tube beginning of 3-hour interval.....	37.6 million
Control tube at end of 3-hour interval.....	562.3 million
Tube containing rough antiserum (unheated) at end of 3-hour interval.....	31.3 million
Tube containing rough antiserum (heated) at end of 3 hours.....	28.0 million
Tube containing normal serum (unheated) at end of 3 hours.....	536.0 million
Tube containing normal serum (heated) at end of 3 hours.....	424.3 million

Clumping was present only in the medium containing the rough antiserum. It is thus seen that both the normal and rough type serums were bactericidal, but that the rough antiserum was 17 times more effective. As an explanation of this bactericidal effect of the rough antiserum, it might be stated that the rabbits were vaccinated toward the end of their immunization with living organisms, according to the method of Ten Broeck.<sup>39</sup>

With this information in hand, the automatic transferring device was set up with 10% unheated "rough" antiserum in hormone broth as the medium and the clock set, as previously, for a 6-hour interval of transfer. A 50 cc. flushing chamber was used in order to increase the amount of culture to facilitate the feeding of guinea-pigs as well. The experiments relating to guinea-pigs will be described following those on white mice.

After 37 passages in the serum hormone medium, the 37th passage and a control culture grown for 18 hours in the same medium were standardized in Hopkin's tubes. The resulting suspensions were plated as a further check, on account of the bacteriolytic properties of the serum. The following dilutions and mice were fed as previously described.

Number of Mice	Number of Organisms
Control ..... { 10.....	0.2 cc. of 1: 1,000; 127,600
{ 10.....	0.2 cc. of 1: 10,000; 12,760
37th passage..... { 11.....	0.2 cc. of 1: 1,000; 364,800
{ 10.....	0.2 cc. of 1: 10,000; 36,480

A discrepancy existed between the number of organisms fed the control mice and the passage mice, but this was uncontrollable.

Results: An examination of table 6 shows no increase in the mortality of the mice fed the 37th passage in rough antiserum broth. The interval between feeding and death of those mice fatally infected was too variable to draw any definite conclusions. Approximately 24% more of the control mice were infected than those receiving the passed culture, as table 6 shows. The control mice succumbing to infection were more diffusely infected than those receiving the passed culture—the

39. Rockefeller Inst. M. Res., 1918, 28, p. 119.

organism being recovered in a higher percentage from the tissues examined. The same was true of the mice surviving infection, to a somewhat lesser extent, however.

In other words, no indication of enhanced virulence, was manifest after transplanting the organism 37 times at 6-hour intervals in hormone broth to which was added 10% "rough" type B. aertrycke antiserum.

TABLE 6.—FEEDING EXPERIMENT 9: WHITE MICE, 6-HOUR INTERVAL

## COMPARISON OF % MORTALITY

Dilution	Control	37th
1:1000.....	20	18
1:10,000.....	50	30

## COMPARISON OF AVERAGE INTERVAL BETWEEN FEEDING AND DEATH

Dilution	Control	37th
1:1000.....	6.5 days	12.5 days
1:10,000.....	12.6 days	8.0 days

## COMPARISON OF % OF TOTAL NUMBER OF MICE INFECTED

Control	37th
95	71.4

## COMPARISON OF % DISTRIBUTION AMONG ORGANS

	Of Mice Dying from Infection		Of Mice Surviving Infection	
	Control	37th	Control	37th
Liver.....	100	40	92.3	68.7
Spleen.....	85.7	40	84.6	75.0
Heart blood.....	100	40	15.3	12.1
Lung.....	100	60	30.7	25.0
Kidney.....	100	40	23.0	31.2
Stomach.....	100	20	38.4	18.7
Intestine.....	100	40	30.7	31.2
Bone marrow.....	71.4	20	23.0	25.0

## SUMMARY AND DISCUSSION

In these experiments there are naturally certain factors that will tend to make more difficult an exact interpretation of the findings. Such factors are, host susceptibility and immunity, unavoidable discrepancies in dosage, and the environment under which the experimental animals exist. It is therefore apparent that any result obtained must be of a definite character in order to render plausible interpretations.

In the course of the previously described protocols, all mice were of the same breed. The doses fed were standardized as accurately as possible under the conditions stated and the animals kept under good sanitary conditions. The mice were fed a regulation diet of cracked barley, bread and water daily. With such provisions, the results of the foregoing experiments should be reviewed.

With regard to the feeding experiments performed with white mice, there was actually no well-marked increase in virulence either after prolonged passage in plain hormone broth at either 3 or 6-hour intervals, or in "rough" antiserum broth at 6-hour intervals. In making this statement due consideration has been given the four criteria previously mentioned as a determination of increased virulence. The mortality rate never varied considerably between the passed cultures and the controls, and was usually higher among the control mice. It is also interesting to note that in the majority of experiments, the percentage of infections was usually the same for both sets of mice, and the most common seats of infection were the liver and spleen; mice succumbing usually presented a septic infection at the time of death.

The average interval of time between feeding and death varied so much that no importance could be attached to it, except that it illustrated the relative susceptibility of the mice to a fatal infection.

The other factor, namely the distribution of the organism in the tissues of the animal host, also varied considerably. The main value of this point was to give an idea of the severity of invasion by the organism. There was practically no discernible difference, however, since mice fatally infected harbored the organisms in every organ, whether fed the control or passed culture. Mice surviving the infection harbored the organisms in the liver and spleen in the majority of cases.

In other words, either the virulence of the organism could not be raised by the described methods, or its virulence had already reached such a degree that no experimental measures could exalt it any higher. The latter surmise seems most plausible, when an examination of the tables will show that as few as 6,000 to 20,000 organisms given by mouth produced fatal infections in control mice. Topley and Ayrton<sup>40</sup> were also able to fatally infect mice with similar doses, whereas Pritchett<sup>41</sup> and Webster<sup>42</sup> used the maximum lethal dose of 5 million organisms; with such an enormous number of bacteria, fatal infection was hardly avoidable.

#### CONCLUSIONS

It was found impossible to raise the virulence of a strain *B. aertrycke* for white mice after prolonged passage in the device described by Weiner, either by 3 or 6-hour intervals in plain hormone broth or by

40. J. Hyg., 1924, 22, p. 234.

41. J. Exper. Med., 1926, 43, p. 143.

42. Ibid., 1923, 37, p. 231.

6-hour subcultures in broth containing antiserum for the "rough" type of *B. aertrycke*. The fact that the virulence could not be raised for white mice is explained by the supposition that the strain of *B. aertrycke* was already in a state of maximum virulence for these animals. Finally, the term virulence must be indelibly associated with host-environment, susceptibility and immunity as well as with the invasive powers of any particular organism.





## CUTANEOUS IMMUNIZATION AGAINST THE STREPTOCOCCUS OF GUINEA-PIG LYMPHADENITIS

L. D. HERTERT AND K. F. MEYER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco, California*

During the fall of 1927 a shipment of guinea-pigs suffering from cervical lymphadenitis was received at the laboratory. The disease more commonly known as "lumps" is caused by a hemolytic streptococcus. A detailed account of the outbreak and the bacteriological findings will be made the subject of a later paper. While studying this malady it was noted that the portal of entry was the skin, a fact observed by Boxmeyer<sup>1</sup> as early as 1907. Preliminary experiments indicated that intracutaneous injections infected with far greater regularity than subcutaneous, intraperitoneal or intrathoracic. The intradermal application of 0.1 cc. of a 12 or 24-hour broth culture produced the characteristic lesions in the lymph nodes in from 10 to 15 days after infection.

In the light of these observations it is evident that the streptococcus is admirably suited to study the value of culture filtrates and vaccines in the production of localized cutaneous immunity. The bacteria are of guinea-pig origin, they infect in small doses, they incite lesions within 10 days and they produce a strong "antivirus" in vitro, provided the specifications of Besredka are followed.

In a series of papers,<sup>2</sup> later collected and published in book form,<sup>3</sup> Besredka published his theory on localized immunization by means of "antivirus" filtrates. Using wet dressings applied to the skin or by intradermal infiltration he was able to protect guinea-pigs and rabbits against subsequent generalized infections provided the living microorganisms were injected into the immunized area. Rivalier<sup>4</sup> working with rabbits obtained similar results and Rutkowski<sup>5</sup> arrived at the same conclusion while experimenting with joint infections.

Received for publication, March 12, 1929.

1. J. Infect. Dis., 1907, 4, p. 657.

2. Ann. d. l'Inst. Pasteur, 1921, 35, p. 422; Compt. rend. Soc. de biol., 1923, 88, p. 1273; 89, p. 7.

3. Local immunization (translation by Harry Plotz), 1926.

4. Compt. rend. Soc. de biol., 1923, 89, p. 711.

5. Ibid., 1927, 96, p. 319.

Gratia<sup>6</sup> in 1923 maintained that the immunity could not be ascribed to the antiviral since he was able to produce a similar refractive state by the use of sterile broth. Gay in an extensive series of articles<sup>7</sup> has reviewed the literature in a thorough manner and advances a theory of clasmatocyte response due to the stimulation of either sterile broth, antiviral broth, or vaccine. The local immunity is nonspecific but very evident and he supports his position by the histologic demonstration of a visible clasmatocyte infiltration following the injection of broth. Freedlander and Toomey<sup>8</sup> uphold Gay's contention. They have found that sterile broth worked equally as well as an antiviral and that broth compresses of either sort were effective in the production of a local immunity against a subcutaneous injection of *Staphylococcus aureus*. They also present histologic evidence of a clasmatocyte proliferation in the immunized areas.

Rivers and Tillett,<sup>9</sup> while working with immune serums found that they could induce a local immunity but likewise decided that it was nonspecific in that an identical protective mechanism followed the injection of normal serums.

Birkhaug,<sup>10</sup> who studied the effect of immune serums, found a definite local immunity by passive transfer of an antistreptococcal erysipelas serum. Local protection could not be established by means of normal rabbit serum. Subsequently these observations were confirmed<sup>11</sup> clinically on human beings.

Mallory and Marble<sup>12</sup> concluded that the immunity was local and nonspecific. Amoss and Bliss,<sup>13</sup> also working with the streptococci of erysipelas demonstrated a definite local immunity by repeated cutaneous infections. The same area was slightly resistant to *Staphylococcus aureus*.

Cooper<sup>14</sup> established in rabbits an immunity to type 1 pneumococci by vaccinating the buccal mucosa. Attempt to immunize in any other manner failed. The immunity in this instance was general but could be produced only by treating a localized area.

6. *Ibid.*, 1923, 89, p. 28.

7. *J. Immunol.*, 1923, 8, p. 1; *Physiol. Rev.*, 1924, 4, p. 191; *Arch. Path.*, 1926, 1, p. 857; *J. Infect. Dis.*, 1922, 31, p. 101; *J. Infect. Dis.*, 1923, 33, p. 338.

8. *J. Exper. Med.*, 1928, 47, p. 663.

9. *J. Exper. Med.*, 1925, 41, p. 185.

10. *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1925, 37, p. 307.

11. Birkhaug, K. E.: *J. Am. M. A.*, 1926, 86, p. 1411.

12. *J. Exper. Med.*, 1925, 42, p. 465.

13. *J. Exper. Med.*, 1927, 45, p. 411.

14. *J. Infect. Dis.*, 1926, 38, p. 491.

Miller<sup>15</sup> observed an increased resistance in rabbits and guinea-pigs treated with filtrates. He concluded that the reaction was nonspecific since a refractory state could also be produced with sterile broth or serum.

However, Meyer and Batchelder<sup>16</sup> found the skin of guinea-pigs completely and specifically protected against highly virulent strains of *Pasteurella muricida* of rat origin 18 hours after the intracutaneous injection of sterile filtrates of the organism. Sterile broth failed to render the integumentum immune. According to Kollath and Sterfarth who tested the influence of antiviral dressing in the course of fresh intracutaneous staphylococcal infections in the rabbit a definite protective action is exerted by broth repeatedly shaken with ether. Although working with a coccus of rabbit origin they failed to note any specific immune reaction and they are therefore inclined to class the observations with those commonly noted in the field of nonspecific reactions. Only the percutaneous application but not the cutaneous injection protected.

The diversity of results are probably due to the variety of bacteria which have been employed and to the experimentation on rabbits and guinea-pigs with cocci which were primarily of human origin. It is unfortunate that the observations have been used to explain the definite and in many cases, excellent and striking results secured in the clinical treatment of acute and chronic suppurative processes in man with antiviral filtrates. The therapeutic results are in all probability due to a number of factors which cannot be explained by the theory of local immunity. The experiments to be reported in this and subsequent papers lend support to this contention.

#### EXPERIMENTS

A Besredka filtrate was prepared in veal infusion broth containing 0.1% glucose with strain 1 (isolated from a cervical node of a typical "lumps" infection in a guinea-pig). After the culture had been incubated for 10 days the organisms invariably failed to grow on subculture. The culture was passed through a Mandler filter, the  $P_H$  adjusted to 7.0 and reinoculated with 1 cc. of a 24-hour culture of the homologous strain. No visible growth was noted during the course of the next 4 days. The filtrate was again inoculated with another strain but the tubes remained clear. It was finally filtered to free it

15. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1927, 107, p. 253.

16. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1926, 23, p. 730.



of any remaining viable organisms. Obviously, the filtrates contained an inhibiting substance which contrary to the views of Louros and Gaessler<sup>17</sup> in accordance with those of Barg,<sup>18</sup> Reichel,<sup>19</sup> Lepanto<sup>20</sup> and others is not due to the acid produced but the result of an exhaustion of the medium in certain amino acids essential for the growth of the streptococcus.

Two series of 8 guinea-pigs each were prepared in the following manner: two guinea-pigs (tests) each received 1 cc. of filtrate intradermally, two guinea-pigs (broth controls) each received 1 cc. of sterile glucose-veal broth intradermally, two guinea-pigs (general immunity controls) each received 1 cc. of filtrate intradermally, and two guinea-pigs (normal controls) were not given injections. The various fractions were injected intradermally into an area of approximately two square inches on the right flank of each guinea-pig. Twenty-four hours later series 1 received 0.1 cc. of a 12-hour culture intradermally. The filtrate tests and broth control groups were inoculated in the center of the area of infiltration. The general immunity control received its injection in the opposite flank. At this time also 2 guinea-pigs were each injected with 2.5 cc. of filtrate subcutaneously and 2.5 cc. intraperitoneally as a control for the sterility of the filtrate.

Forty-eight hours after the infiltration series 2 received its infecting dose in exactly the same manner as series 1. The animals were held for 10 days and then killed and examined; cultures were taken from the various lymph-nodes, the spleen and the heart blood. Macroscopically the nodes presented a typical appearance of lumps which was confirmed by culture.

In series 1 and 2 the intracutaneous injection of filtrates failed to prevent the spread of streptococci from the skin to the regional lymph-nodes. Each animal of both series showed typical localized lymphatic infection at the end of 10 days. The 2 guinea-pigs receiving filtrates only revealed no lesions, and furnished sterile cultures. From this it must be concluded that the filtrate may possess marked inhibitory properties *in vitro* and still be worthless for the local intradermal protection of guinea-pigs against a specific streptococcic infection through the skin.

17. *Klin. Wchnschr.*, 1927, 6, p. 1662.

18. *Centralbl. f. Bakteriol.*, I, O., 1927, 102, p. 398.

19. *Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap.*, 1928, 54, p. 478.

20. *Giorn. di batteriol. e immunol.*, 1928, 3, p. 385.

In the next experimental series a vaccine was substituted for the filtrate. The organism was grown for 48 hours in glucose-veal infusion broth. The centrifugated sediment was suspended in .85% salt solution and sterilized by heating at 55 C. for 1 hour. The vaccine was then standardized to contain two billion organisms per cc. as estimated by the Hopkins tube method.

Two series of 8 guinea-pigs each were selected and treated as in the previous experiments substituting vaccine for filtrate. Two animals were injected, each receiving 5 cc. of vaccine as a control for the sterility of the vaccine. No lesions could be demonstrated in these animals at necropsy.

After 24 hours each animal in series 3 received an infecting dose of 0.1 cc. of a 12-hour culture in exactly the same manner as series 1 and 2. Series 4 was infected 10 days after the vaccine infiltration.

As in previous experiments the animals were observed for 10 days, killed by neck stroke and examined at necropsy to determine the extent of the lesions. Again every animal was found to be infected.

It was realized that repeated injections might produce a local defense. A series similar to 3 and 4 was prepared, using the same vaccine, infiltrating the flank area on alternate days and giving a total of three injections. These animals were observed for 5 days and then given the infecting injection. Ten days later the necropsies indicated extensive infection of lumps in every animal.

The analysis of the foregoing experiments indicates that the intracutaneous injection of filtrates containing the antiviral of Besredka does not protect guinea-pigs against an infection with the streptococcus of lymphadenitis. Furthermore, no immunity was induced by cutaneous application of either single or multiple vaccine infiltrations or of sterile broth. This, to our knowledge, is the first series of experiments on local immunization with an organism adapted to the guinea-pig and with a strain of streptococcus which discriminately selects the skin as a portal of entry.

Since in the experiments the cells of the derma were neither "desensitized" in the sense of Besredka nor rendered "more resistant" in the sense of Gay it appeared unnecessary to analyze the phenomenon of local immunity. It is certain that the intradermal injection of filtrates or vaccines neither closed the portal of entry nor protected the procedure chosen the locus of *minoris resistentiae*. One is obviously not justified to draw analogous deductions from experiments on rabbits but one should emphasize anew that the fundamental factors of

pathogenesis and immunity when studied on animals should be conducted with bacterial strains specific for the species and not with organism of human origin.

#### SUMMARY

The streptococcus of guinea-pig lymphadenitis has been used in the study of local immunization leading to the following conclusions: no protection could be demonstrated by means of Besredka filtrates; the portal of entry could not be closed by means of single or multiple injections of heat-killed streptococcic vaccines, and no local nonspecific resistance could be induced by intradermal injection of sterile broth or salt solution.







## BACILLUS DYSENTERIAE\*

### SOME OBSERVATIONS ON A CALIFORNIA STRAIN

By JEANNE LOMMEL, M. D.<sup>†</sup>

San Francisco

In America, cases of dysentery due to the bacillus of Sonne (see Group 3 in later classification) have not attracted the attention of the physician, probably due to the fact that the clinical manifestations are not very marked and that the microbiological diagnosis is frequently not attempted. During the past twelve years the bacillus has been observed in various countries. The first publication of Sonne,<sup>1</sup> d'Herelle<sup>2</sup> the organism in France; Thjötta<sup>3</sup> in Norway; Oehnell<sup>4</sup> in Sweden; Mita<sup>5</sup> in Japan; Patterson and Williams<sup>6</sup> in Australia; Smith<sup>7</sup> and Channon<sup>8</sup> in England, the latter from a patient who had contracted dysentery in Egypt. It is probable that carriers of this organism have been checked this country.

#### A CALIFORNIA STRAIN

A strain has been recently isolated in this laboratory from a child at the University of California Hospital. The patient gave no previous history of illness, but on admittance presented for symptoms mild diarrhea with blood and mucus in stool. Another child in the same family had similar symptoms. It is of interest that a child returning from Norway, had had no previous attacks of dysentery shortly before the other children became ill.

Smears of mucus plated on eosin methylene blue agar revealed numerous colonies of non-fermenting Gram-negative bacilli which were not agglutinated by a polyvalent antidyserium (English type strains, Andrews and Channon<sup>8</sup>).

#### CHARACTERISTICS OF THE CALIFORNIA STRAIN

A more detailed study was therefore undertaken. The organism, designated Hin., is a non-sporulating Gram-negative rod, which does not liquefy gelatin, coagulates brom cresol purple milk after three days, gives negative Proskauer and methyl red reactions, fails to ferment peptone water. It forms acid but no gas from glucose, levulose, mannite, l-arabinose, galactose, maltose; and fails to ferment, after three weeks' incubation, the following: sucrose, saccharose, dulcitol, adonite, inositol, inulin, and xylose.

The strain is not agglutinated by the following antiserum sera: Shiga, Hiss, Flexner and Channon. After numerous subcultures on agar and gelatin, the same results were obtained. A

serum prepared on rabbits with the bacillus Hin. had a titer of 1:4000 for the homologous antigen and a titer of 1:2000 for a strain of paratyphoid dysentery Sonne No. 31 obtained from the national type culture collection, but no reactions with representatives of the colon-paratyphoid dysentery group. It is, therefore, serologically and culturally identical with the strain "Sonne." A serum titer (1:4000) prepared with the type strain Sonne No. 31 agglutinated the Hin. to the titer limit. In the absorption tests the same specificity was observed. The antiserum Hin. absorbed with either the Sonne strain or the homologous antigen, lost its agglutinins for both. The antiserum Sonne behaved in the same manner. Complement fixation tests with saline suspensions also showed that the strain Hin. was identical with the type Sonne.

The Hin. culture is weakly pathogenic for rabbits. In order to prove that the stability of the cultural and the serological characteristics are not altered by animal passage, three rabbits (approximately 2 kilograms in weight) were injected intraperitoneally. One animal which had received five agar slants succumbed to the infection. The infected bacteria were found in the bile, the liver, the spleen, the small intestine, and the mesenteric lymph nodes, but not in the heart blood. The isolated strain exhibited the same biochemical and serological reactions as the parent culture.

#### CLASSIFICATION OF THJÖTTA

Thjötta,<sup>3</sup> studying serologically a great number of dysentery strains, proposed the following classification:

*Group 1:* The Shiga type (nonmannite fermenting, toxic type).

*Group 2:* The Flexner, Strong and Y type (mannite fermenting, atoxic type, pseudodysentery bacilli, Sonne's Groups 1 and 2).

*Group 3:* Group 3 of Sonne (the new members of the mannite fermenting types).

#### COMMENT

The strain Hin., isolated in San Francisco, has the cultural and the serological characters of Group 3, corresponding also to the Group 3 of Sonne. Its biochemical characters also are the same with the exception that saccharose is not fermented.

Hooper Foundation, University of California.

#### REFERENCES

1. Sonne: Giftfattige Dysenteribaciller, 1915. Kjøbenhavn. Ztschr. f. klin. Med., 1915, 81, p. 73.
2. d'Herelle: Ann. de l'Inst. Pasteur, 1916, 32, p. 145.
3. Thjötta: J. Bacteriol., 1919, 4, p. 355 and p. 360.
4. Oehnell: 1917 Kliniske og bakteriologiske studier ved en nosokomial dysenteriepidemi, 1916. Almqvist och Wiksells svenska läkartidning.
5. Mita: J. Infec. Dis., 1921, 29, p. 580.
6. Patterson and Williams: M. J. Australia, 1922, 3, p. 608.
7. Smith: J. Hygiene, 1926, 25, p. 453.
8. Channon: J. Path. and Bacteriol., 1926, 29, p. 490.
9. Andrews and Inmann: Med. Res. Committee.



## MUSSEL POISONING

K. F. MEYER, H. SOMMER AND P. SCHOENHOLZ

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco*

Received for publication June 29, 1928

Food poisoning outbreaks or food infections due to contaminated shellfish, oysters and mussels have been recorded on numerous occasions, and epidemics of typhoid fever have been traced to the consumption of mussels (*Mytilus edulis* L). However, another source of danger in utilizing sea mussels as food must be attributed to poisons which sometimes occur within this mollusk. Single cases of these forms of poisoning are rarely recorded in the medical literature. In fact, very few group intoxications have been reported in recent years. This may in part explain why the public prejudice which has grown up against the sea mussels has gradually disappeared, and the fact that fresh shellfish may fatally poison human beings has practically been forgotten. As recently as 1922 J. A. Field<sup>1</sup> concludes, in a monograph on the "Biology and Economic Value of the Sea Mussel," that "mussels possessing this poisonous quality [referring to the Wilhelmshafen cases] are very rarely met with and to the knowledge of the author have never been discovered on either the Atlantic or Pacific Coasts of the United States." It is therefore not surprising that the sudden appearance of a large number of cases which developed during the month of July, 1927, in San Francisco and its vicinity attracted a great deal of attention in the daily press and gave rise to all kinds of rumors and statements. A superficial comparison of the California group intoxications with those reported from Europe immediately indicated certain interesting epidemiologic differences and invited a careful study of the whole subject of mussel poisoning. The collaboration of the California State Department of Health and the State Fish and Game Commission has enabled us to make a broad inquiry. Although the nature of the

<sup>1</sup> Bull. Bureau of Fisheries, 1921-1922, 38: 234 (Document No. 922).



TABLE 1  
Single and group cases of mussel poisoning 1798-1928\*

AUTHOR OR REFERENCE	LOCALITY	TYPE OF MUSSEL	MONTH	YEAR	NUMBER OF SICK	NUMBER OF DEATHS	POISONED ANIMALS
Vancouver <sup>8</sup> (1798)	Pacific Coast of North America	—	(?)	1793	3 (Several)	1	
Combe <sup>9</sup> (1828)	Leith (Scotland)	<i>Mytilus edulis</i>	June	1827	30	2	1 dog, 1 cat
Brit. Med. Jour. (1857)	Victoria Dock, Hartlepool (East coast of England)	<i>Mytilus edulis</i>	August	1857	Several	1	
Crumpe <sup>9</sup> (1872)	Tralee (West coast of Ireland)	<i>Mytilus edulis</i>	(?)	1872	3	3	
Crumpe <sup>9</sup> (1872)	Tralee (West coast of Ireland)	<i>Mytilus edulis</i>	(?)	1872	1	(?)	
Brit. Med. Jour. (1872)	Liverpool (England)	<i>Mytilus edulis</i>	October	1872	2	1	
Virchow, <sup>10</sup> Wolff (1885)	Wilhelmshafen (Prussia)	<i>Mytilus edulis</i>	October 17	1885	19	4	Chicken and cats
Schmidtman <sup>16</sup> (1887)	Wilhelmshafen (Prussia)	<i>Mytilus edulis</i>	September	1887	3	1	
Permewan <sup>15</sup> (1888)	Liverpool (England)	<i>Mytilus edulis</i>	August 29	1888	3	1	
Cameron (1890)	Seapoint near Dublin (Ireland)	<i>Mytilus edulis</i>	June 30	1890	7	5	
Todd, G. B. (1891)	—	(?)	September	1891	1	—	
Thesen <sup>12</sup> (1902)	Christiania (Norway)	<i>Mytilus edulis</i>	May	1901	5	2	
Dr. C. E. Carr (personal communication)	Timber Cove (California)	(?)	(?)	1903 (?)	12	5	
Rolle <sup>13</sup> (1904)	Avonmouth (West coast of England)	<i>Mytilus edulis</i>	June	1904	2	1	
Netter and Ribadeau-Dumas <sup>15</sup> (1907)	Calais (Bassin, Carnot, France)	(?)	May 23	1907	13	2	1 cat, 6 chickens
Neale (1909)	Barry (South Wales)	(?)	August (?)	1909	19 (Several)	1	
Personal Communication	Santa Cruz (California)	(?)	(?)	1915	4	0	8 chickens
California State Board of Health	Santa Cruz (California)	<i>Mytilus californianus</i>	July 16	1917	13	2	
Prof. C. A. Kofoid and T. W. Vaughan (personal communication)	La Jolla (California)	<i>Mytilus californianus</i>	September	1918 (?)	1	0	Several chickens
K. F. Meyer (1928 here reported)	14 places on Pacific Coast line 45 miles north and south of Golden Gate	<i>Mytilus californianus</i>	July 14-17	1927	102	6	Cats and chickens
Personal Communication	Coos Bay (Oregon)	(?)	(?)	(?)	Many people	—	

\* In this compilation the original publications have been consulted in order to eliminate from a similar table of Netter and Ribadeau-Dumas those cases of mussel poisoning which were unquestionably not caused by the paralytic poison of the mollusks.

problem demands a continuous investigation for a number of years, it is deemed important to report the observations which have been collected during the past ten months.

The various single or group intoxications due to sea mussels reported in the literature and the observations made in California are summarized in table 1. Since 1793 approximately 244 people have been poisoned and 38 (15.6 per cent) have succumbed to the intoxications following the ingestion of toxic mussels. Of the 21 observations, five occurred in England and five in California, three in Ireland, two in Prussia and two on the northern Pacific coast and one each in Scotland, Wales, Norway and France. The highest mortality (37 per cent) was noted in the outbreak (about 1903) at Timber Cove, California, and the lowest (5.8 per cent) in the 1927 outbreak in the vicinity of San Francisco.

The data indicate that shellfish poisoning is by no means uncommon on the Pacific coast. In one locality, Santa Cruz, two groups of people were poisoned in the course of a few years. Then, again, the occurrence of toxic shellfish is not confined to California, cases also having been noted in Oregon and Washington. A disastrous outbreak (100 deaths) in *Alaska* has not been included in the table since the description of the clinical manifestations is not sufficiently detailed to permit the identification conclusively of the form of mussel poisoning. In 1799 a troupe of Aleut hunters from Unalaska and Kodiak stopping at a place now known as Peril Way (near Sitka, Alaska) consumed mussels and according to Aurel Krause,<sup>2</sup> Dale<sup>3</sup> and Petroff<sup>4</sup> 100 men died in less than two hours. It was supposed that the intoxications were caused by poisons generated in the liquor of the shellfish which had been exposed to the sun for long periods. Dale states that the Aleuts of this region informed him that mussels which were never exposed at low tide were always safe to eat.

No doubt exists regarding the nature of the illness which in 1793 affected several members and caused the death of one of an English expedition<sup>5</sup> to the northwest coast of America at a place now known as

<sup>2</sup> "Die Flinkit-Indianer," Jena, 1885, p. 91.

<sup>3</sup> "Alaska and Its Resources," Boston, 1870.

<sup>4</sup> Report on the population, industries and resources of Alaska, Tenth Census of the U. S. A., Washington, 1884, 8: 123.

<sup>5</sup> "Vancouver—A Voyage of Discovery to the North Pacific Ocean," London, 1798.

Vancouver. The onset and the course of the intoxication identify it with the disease seen in 1927.

From time immemorial it has been the custom among coast tribes of Indians, particularly the Poma, to place sentries on watch for Kal ko-o (mussel poison). Luminescence of the waves, which appeared rarely and then only during very hot weather, caused shellfishing to be forbidden for two days; those eating shellfish caught at such times suffered sickness and death (personal communication from Dr. John W. Hudson, Ukiah). According to a report a band of Indians died about fifty years ago from eating mussels gathered on the Mendocino coast during the month of August.

Reliable data are not available but in the course of several field investigations, unsolicited statements and letters sent to the senior author suggest that for the past twenty or thirty years single cases and group intoxications due to shellfish, readily distinguishable from the erythematic and choleraic form of mussel poisoning, have occurred in the following California localities: Santa Cruz, Marin (Stimson Beach), Sonoma, Humboldt and San Diego Counties. A small group of California cases were investigated in 1917.<sup>6</sup> However, the most extensive outbreak ever observed developed in 1927 in San Francisco and the adjacent counties. The circumstances which lead to the serious illness of many people are briefly as follows:

#### THE 1927 CASES OF MUSSEL POISONING IN CALIFORNIA

On July 16, 1927, the San Francisco evening papers carried an account of two deaths due to the eating of steamed, fresh mussels gathered on the rocky coast south of the Golden Gate. In the course of the next three days with catastrophic swiftness four additional deaths and many severe cases of poisoning were reported from places north of the city. A hurried survey on Monday, July 18, and the constant telephonic calls from physicians, hospitals and patients clearly indicated that with very few exceptions practically everybody who had on Sunday, July 17, eaten sea mussels which had been gathered in certain localities along the coast was poisoned in a very characteristic manner. From a canvass made by Dr. P. M. Ellwood,<sup>7</sup>

<sup>6</sup> California State Bd. of Health Monthly Bull. 1917-1919, 13: 171.

<sup>7</sup> Assistant epidemiologist, California State Department of Health.



and from letters and reports sent to the Hooper Foundation, the total number of people involved in this group intoxication is estimated at 102. This figure is only approximative. The original figure of 75 had to be changed because during the course of several visits to families who had been poisoned additional histories of poisoning cases in friends or relatives were unearthed. It is not unlikely that only the severe and moderately severe forms of illness have been recognized and tabulated. Of the 102 people, 56 were men (age 24–65 years), 8 boys (age 2–12 years), 34 women (age 20–60 years) and 4 girls (age 3–15 years). They had eaten steamed or cooked or raw mussels of one of the Pacific Coast varieties (*Mytilus californianus*) freshly gathered in different places which are located approximately 45 miles south and 50 miles north of the Golden Gate.

*Clinical symptoms.* The symptoms which developed after the consumption of the steamed, or in one case of the raw, shellfish are best illustrated by a few unselected histories of moderately severe cases.

(1) *L. W.*, age 15, ate approximately two dozen steamed mussels on the evening of Sunday, July 17. The shellfish had been gathered at Montara. Ten minutes after eating, a numbness of the lips, tongue, cheeks, finger tips and toes was noted. On retiring patient slept fairly well, but in the morning she awoke dizzy and weak with definite signs of numbness. At the hospital on July 18 it was found that her pupils reacted to light and accommodation; there was no diminution in touch or pain sense over the areas of numb feeling; the reflexes were normal and the temperature range was 98–99.2°F.; the pulse range 72–120 and the respirations 18–120; no stools were recorded.

(2) A middle-aged well built man called at the laboratory. He has an ataxic gait but speaks distinctly and states that he had been poisoned by eating mussels. On Sunday, July 17 at one p.m. during low tide he gathered mussels which were submerged at a place approximately three miles west of Pescadero. No sewage discharges into the sea within twenty miles. Late in the afternoon the carefully washed shellfish were steamed for about twelve or fifteen minutes. The hot and thoroughly cooked mollusks tasted good and he ate about two quarts (three dozen small size) and his wife about six small mussels during the evening meal. About fifteen minutes after eating he felt nauseated but could not vomit. He felt drowsy, went to bed, and had a restless sleep continually interrupted by dreams. Although he



did not feel well in the morning he went to his business. About 10:30 a.m. he noticed a general numbness and weakness in his limbs and soon afterwards a tingling sensation and numbness around the lips, chin and cheeks and particularly in the thumb of the left hand. These symptoms still persisted during his examination on July 18. The reflexes were present and active, the pupils reacted to light and were dilated. The temperature was 98.4°F. The numbness gradually disappeared during the afternoon. The broth (0.5 cc.) of the steamed mussels killed a mouse within three minutes.

During the meal the patient fed several mussels to three half-grown kittens and one cat, and two mollusks to a police dog. The dog vomited within twenty minutes, but was not otherwise affected. The three kittens died during the night at the same place where the food had been offered in the evening. The cat showed a complete posterior paralysis eighteen hours after eating the mussels, but recovered.

(3) Dr. W. collected at seven a.m. Sunday morning, July 17, during low tide a sackful of mussels approximately two miles above Bodega Bay. Since he is experienced in the gathering of mussels he took only bivalves which were under the water line. On numerous occasions he had taken mollusks from the same place, which is on a rocky promontory on the north side of a little beach. The mussels were cooked at five p.m. and thoroughly mixed with garlic. Since they looked all right, Dr. W. consumed the broth and mussels on an empty stomach. After the lapse of an hour, he noticed a peculiar numbness of the lips and feet, a prickly feeling in the finger tips; his mind remained clear. Late in the evening he took a large dose of epsom salt and went to bed. He was aroused by a feeling of nausea, vomited a large amount of food; he had also diarrhea. Recovery was rapid and when seen on Thursday, July 21, he was perfectly well, although he looked as though he had passed through some illness.

His father and mother-in-law and nephew all ate of the same mussels together with the regular meal and were not affected. The sister-in-law, who ate the mussels from the same lot on an empty stomach, developed identical symptoms but complained of a peculiar lightness or "rising feeling." She was treated with epsom salt and completely recovered. Dr. F., who participated in the meal with Dr. W., had a typical ataxic gait ("as if he was wading in deep water"). The tingling of the fingers was very marked, but his mind was clear and he was in a rather joking mood, never considering the intoxication in any way serious. Mrs. W. showed very slight symptoms. Following the administration of epsom salt she developed a fainting spell and a cold perspiration; she complained of a gripping feeling

around the throat, not a choking but a peculiar swelling sensation. Her pulse and temperature were normal and her recovery rapid and uneventful.

(4) A party of three gathered mussels on Sunday, July 17, from the top of a rock at Dillon's Beach at a time when the tide was coming in. The shellfish were carried for a distance of 107 miles, but they appeared in good condition at the time of preparation. They were carefully cleansed, then steamed for ten to fifteen minutes and served hot. It was noticed that several of the shellfish did not contract into a ball as they normally do; these mussels were not eaten. About fifteen minutes after ingestion all three noted a peculiar numbness of the tongue and lips as well as of the mouth. Water tasted flat and cigarettes distasteful. These feelings continued for about half an hour, gradually increasing, at which time tingling and numbness appeared in the finger tips spreading to the hands and subsequently the same symptoms were noted in the toes and feet. Though drastic evacuation with apomorphin and castor oil was induced during the night (about eight hours after the meal which was responsible for the intoxication) two members of the party noted most marked incoördination of both arms and legs. The Romberg reaction was present to an extreme degree. There was some slight dizziness with a mild headache. The numbness and the ataxia gradually disappeared in three days.

The histories of the six fatal cases are unfortunately not complete since it was found exceedingly difficult to obtain data collected by experienced observers. Unaware of any serious illness death took place during sleep or intervened before the patients reached a hospital. In the brief notes which are available the following facts are of interest:

(1) *E. M.*, male, age 56, ate on July 16 as the only meal approximately three dozen mussels which had been steamed for thirty minutes. The bivalves had been gathered on July 16 at Moss Beach. Onset of the symptoms developed during sleep (five hours) and death occurred ten hours after the consumption of the mussels. It is stated that the deep reflexes of the limbs were absent shortly before death. The autopsy findings were negative; the stomach contained a few undigested mussels.

(2) *A. K.*, age 39, ate on an empty stomach on July 15 approximately three dozen steamed mussels which had been gathered the same day at Pedro Point. Symptoms appeared in one hour and the patient died within three hours after the ingestion of the shellfish. The autopsy revealed an empty stomach.

(3) *W. K.*, two-year-old son of Case 2 drank a small glass of broth with two or three mussels; he died five and a half hours after the ingestion of the broth.

(4) *W. W.*, male, age 51, obtained some mussels which had been gathered at Mussel Rock on July 17. He ate approximately a dozen and a half with his light evening meal. He died while asleep about five hours after the consumption of the mussels. At autopsy the stomach was found to contain partially digested mussels. One-half cubic centimeter of an aqueous extract of the food particles killed one mouse on feeding in twenty-two hours while 0.1 cc. subcutaneously was fatal to a mouse in three minutes.

(5) *S. F.*, twelve-year-old boy, ate approximately eight raw mussels together with a small amount of additional food. The mollusks had been gathered by him at Rockaway Beach on July 17. Symptoms developed within half an hour. He vomited once or twice. Paralysis of the limbs progressed rapidly but the mentality remained clear. Death took place  $3\frac{1}{2}$  hours after the meal. At autopsy the stomach was found to be empty and free from any toxic substances.

(6) *E. T.*, male, age 37, died seven hours after he had eaten nothing but a dozen mussels and a considerable amount of broth. The mussels had been gathered the same day, July 17, near Point Reyes; the method of preparation and the course of the illness are unknown.

The most remarkable feature of the clinical picture revealed in the histories, whether they dealt with the mild, moderately severe or fatal cases, is the striking similarity in case after case. It corresponds in every respect with the descriptions which have been given by Combe,<sup>8</sup> Crumpe,<sup>9</sup> Virchow,<sup>10</sup> Cameron,<sup>11</sup> Thesen,<sup>12</sup> Rolfe,<sup>13</sup> and others for the *paralytic form of mussel poisoning*. The manifestations are so characteristic that a confusion with any other form of intoxication is practically impossible.

The symptoms of poisoning are primarily peripheral paralyses which

<sup>8</sup> Edinburgh Med. & Surg. Jour., 1828, 29: 86.

<sup>9</sup> Dublin Jour. Med. Sci., 1872, 54: 257.

<sup>10</sup> Berl. klin. Wchnschr., 1885, 22: 781.

<sup>11</sup> Lancet, 1890, 2: 174.

<sup>12</sup> Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., 1902, 47: 311.

<sup>13</sup> Lancet, 1904, 2: 593.



may vary from a slight tingling and numbness about the lips to a complete loss of power in the muscles of the extremities and neck, and to death by respiratory failure. In a moderately severe case the tingling, stinging sensation around the lips, gums and tongue would develop from five to thirty minutes after the consumption of the mussels. This was regularly followed by numbness or a prickly feeling in the finger tips and toes, and within four to six hours the same sensation would progress to the arms, legs and neck, so that voluntary movements, as for example raising of the head, were made only with great difficulty. In all cases of moderate severity this ataxic weakness and stiffness of locomotion was accompanied by a peculiar feeling of lightness. Some patients declared that they felt as if they were floating or could fly. Even heavy objects appeared to them very light. The reflexes were normal and active. It is stated that in one of the fatal cases the deep reflexes were affected. The mentality remained clear, although dizziness and staggering were noted in some, and drowsiness was observed in three of the fatal cases. A few patients complained of a gripping sensation around the throat and slight respiratory distress. Incoherence of speech was noted in one of the fatal cases. Vomiting was inconstant, while diarrhea and abdominal pain were not recorded in the untreated cases. In fact, a tendency to constipation persisted for several days. Records of the carefully controlled cases showed the average temperature to be slightly subnormal (mean 98°F.). The pulse was firm and slightly accelerated (80–100 per minute). During recovery some patients had chilly sensations in their limbs and for a number of days felt slightly stupefied and were easily fatigued. The blood and urinary findings in the cases seen at the San Francisco Hospital were negative. With the exception of the six fatal cases recovery was uneventful and complete.

The fatal cases were all in males (four men and two boys). The longest period from the time of consumption till death was ten hours, the shortest three hours, and was apparently independent of the amount of mussels consumed. The raw mollusks were just as potent as the cooked. However, there are indications that those who decanted the liquid from the steamed or cooked shellfish before eating them suffered less than those who partook freely of the broth. Since the mussel poison is readily soluble in water these observations indi-



cate that probably a considerable portion of the injurious substance was extracted and discarded. Equally interesting is the fact that the intoxications were mild or failed to develop in those who consumed the shellfish in conjunction with a heavy meal or boiled the mollusks with rice and garlic or mixed them with olive oil. Laboratory experiments indicate that delayed gastric absorption favors the destruction of the poison. People who remained unaffected after the consumption of mussels which had severely poisoned others in all probability owe their immunity to one of these two factors. When the shellfish were taken into an empty stomach the intoxication rate was very high; every member of the group showed symptoms of varying degrees of severity.

*Treatment.* As soon as the condition had been recognized, emptying of the stomach by an emetic and purging by brisk laxatives was the usual practice. In most of the cases this was sufficient. However, in the severe cases although the stomach was emptied, a fatal dose of poison had already been absorbed. Certain cases of paralytic mussel poisoning have such a rapid course that they are not amenable to any therapeutic procedure, and it is questionable if recovery would have been successful if the six cases were treated in earlier time. In any event, aside from the washing of the stomach, stimulants in the form of aromatic spirits of ammonia or black coffee should be used. Rolfe,<sup>13</sup> who had two patients afflicted with the paralytic type of poisoning, noticed that hot strong coffee had a marked beneficial effect upon the pulse and general condition. As soon as dyspnea sets in one should resort to artificial respiration. The clinical observations of Permevan<sup>14</sup> indicate that even in desperate cases this procedure when extended over several hours may prevent a fatal issue.

*Autopsy findings.* The coroner's offices in San Francisco and San Mateo performed four autopsies. No significant findings were recorded in the abdominal or chest cavities except a slight pulmonary congestion. The stomachs were examined by the writers. Three of the organs were contracted and the mucosa was found covered with a brownish adherent slime, while the fourth was distended with food particles, mostly partly digested mussels. In every case the fundus portions were deeply injected and the folds were studded with small hemorrhages. The anterior portion of the duodenum was also

<sup>14</sup> Lancet, 1888, 2: 568.

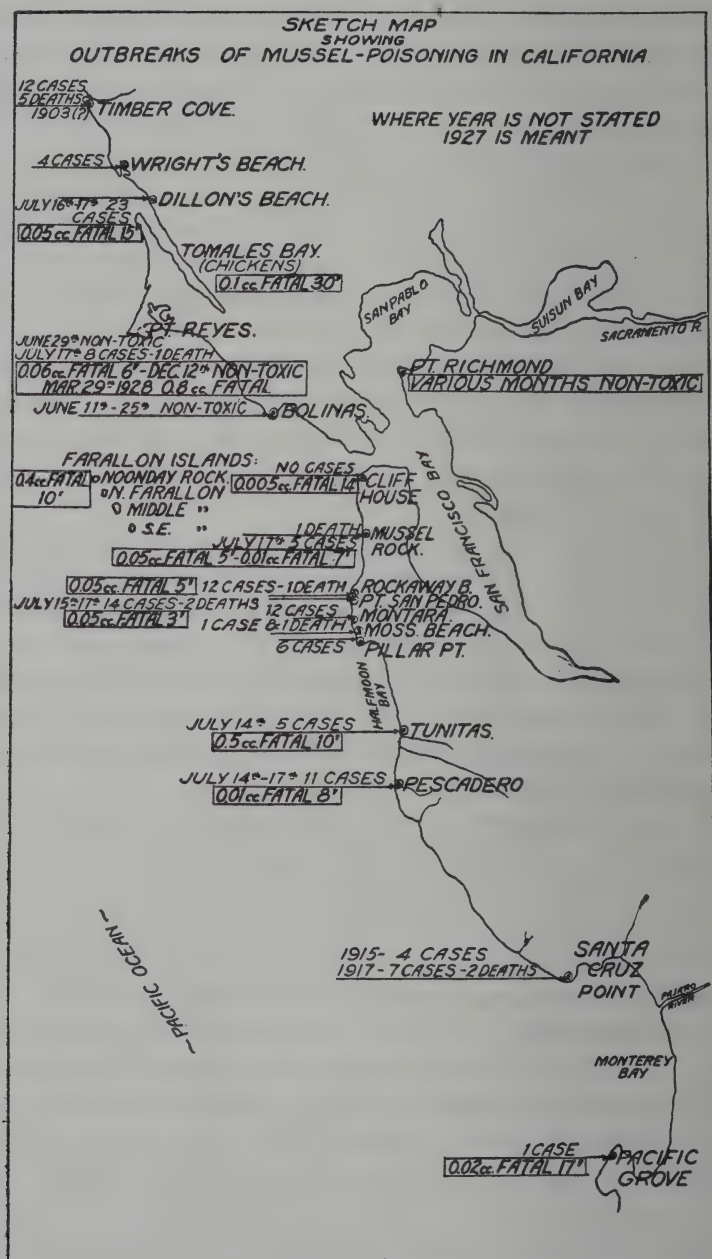
definitely hyperemic. A portion of the mucous and contents was mixed with an equal part of salt solution, boiled for five minutes, filtered and tested on mice. In one case (W. W.), a male who died five hours after eating about a dozen and a half mussels, 0.5 cc. of the extract killed mice on feeding in twenty-two hours and 0.05 cc. on subcutaneous injection was fatal to the same species of animal within five minutes. This observation, the third on record, definitely demonstrated in the gastric contents the presence of the same paralytic poison which was subsequently extracted from fresh mussels. Many years ago Thesen<sup>12</sup> found the mussel poison in the contents of the stomach of two fatal cases in Christiania. Although he concentrated the extracts, at least 1 cc. was required to produce symptoms on subcutaneous injection of mice. In future cases an attempt should be made to detect the poison in the blood stream during life and after death in the various organs.

*Poisoning of animals.* At least three kittens and eleven chickens were fatally poisoned, while several adult cats and one dog were temporarily paralyzed by the ingestion of the same sample of mussels which affected members of several households. The crop contents of two chickens revealed pieces of mussels and proved highly poisonous for mice. In the 1915 Santa Cruz group intoxication eight chickens succumbed to mussel poisoning, while as early as 1828 Combe reported the lethal effect of shellfish for one dog and one cat.

Furthermore, Virchow<sup>10</sup> and Netter and Ribadeau-Dumas<sup>15</sup> mention the death of cats and chickens following the accidental feeding of toxic mussels. The flesh of the birds was eaten without any bad effects.

*Source, condition and method of preparation of mussels.* The poisonous shellfish involved in the 1927 catastrophe originated from at least fourteen different areas or beds on the open shore line of the Pacific coast (see sketch map). The most southerly locality was at Pacific Grove, then followed Pescadero approximately 45 miles south, and finally Wright's Beach approximately 55 miles north, of the Golden Gate. Commercial mussels obtained from various places in the San Francisco Bay were not connected with any of the poisoning cases. In the remains of the meals and the unused batches of raw shellfish which were still available in great quantities one could only find the

<sup>15</sup> Compt. rend. Soc. de biol., 1907, 63: 81 and 195.





well known large Pacific coast species, *Mytilus californianus* Conrad. The small species, *Mytilus edulis* L., always present in the collections of the commercial mussel gatherers, was entirely absent. Furthermore, a diligent search revealed neither *Mytilus adamsianus* Dunker nor any of the straight horse mussels, *Modiolus rectus*, or its related species, *Modiolus modiolus* and *M. nigra*. In size, coloring and consistency of the shells the poisonous mussels differed in no way from those which had been forwarded from Long Beach in Southern California and were found to be non-toxic. A special type of mussel as was once suspected during the Wilhelmshafen group intoxications is certainly not responsible for the San Francisco cases.

The beds from which the people gathered the mollusks on July 14, 15, 16 and 17 are all on the open shore line subject to the ebb and flow of the tides and, with possibly one exception, never exposed to pollution by sewage. An inspection of the places which furnished the majority of the shellfish leaves no doubt that the mollusks were neither located in stagnant basins nor were they exposed to the sun for a long period at low tide. Moreover, the greater portion of the mussels were gathered by people fully acquainted with the popular belief that bivalves exposed above the water line are never safe to eat. Subjected to a searching inquiry they invariably declared that they had gathered shellfish for many years without trouble and had always taken them deep below the water level. In fact, they remembered that on account of the low tide on July 17 they intentionally went out far in order to secure the mussels from places which were covered by the sea. A few victims of mussel poisoning, about 20 per cent of the total, admitted that they were inexperienced and that they used some mussels taken from the rocks above the water line. However, shellfish collected by several investigators were found to be just as poisonous below the water at the lowest ebb as those above the water at the highest flow of the tide. In one test (Pescadero) the mussels below the water were very highly toxic while those on the dry rocks or in holes filled with warm sea water were non-poisonous.

It may be mere coincidence that the earliest cases resulted from the consumption of mussels from the most southerly beds at Pescadero on July 14, the next cases were due to shellfish gathered approximately thirty miles north and the last cases were caused by mollusks taken



from beds at the most northerly end, Dillon's and Wright's Beach. The mollusks probably acquired their harmful properties within a few days. According to dependable information it is known that on June 20 a troop of Boy Scouts enjoyed a hearty meal of mussels collected eight miles above Bolinas. Mollusks were also gathered on June 29 at Point Reyes when the tide was 1.1 low, and were consumed without any ill consequences at Rio Vista. Doubtless, shellfish were used as food on Sunday, July 10, since the weather on the coast was clear and invited picnic parties. No reports of mussel poisoning prior to July 14 have been received. The evidence available indicates that some factor disturbed the beds during the week of the 10th of July. In fact, at one place (Pedro Point) the shellfish became harmful between the 14th and 15th of July. A group of people vacationing near Princeton gathered and ate mussels, without any bad effects, on Thursday the 14th. Again they collected mollusks from the same beds on Friday the 15th and several members of the party were severely poisoned.

In searching for an explanation of this sudden appearance of toxic mussels one factor which might have contributed to the mysterious cycle of events must be noted. Relatively rough weather with strong northerly winds (velocity 16-36) preceded the outbreak; on July 13 the wind suddenly shifted in a southerly direction for a period of three days (velocity 8-24). Moderate northwesterly winds prevailed on the 16th and 17th of July. The tides were neither unusually low nor unusually high; the lowest for the two weeks before the group intoxications was on June 29. Phosphorescence and various other discolorations were noted and emphasized as important by several groups of gatherers. How far these meteorologic and oceanic conditions had anything to do with the mussel poison is merely a matter of conjecture. They are constant phenomena during the summer months but why they should suddenly spell disaster in 1927 to those who consumed the shellfish will remain an unsolved problem until we know more about the chemical nature and the origin of the mussel poison.

In the majority of the histories it is stated that the mussels were carefully washed, placed in a kettle with a small amount of water, garlic, parsley, salt and pepper and steamed between fifteen minutes and half an hour. Preparation of the shellfish took place a few hours

after the gathering; the longest period between the collection and the consumption was twelve hours. No abnormal taste or odor was noted. In fact, many of the patients commented upon the fact that the mussels tasted unusually good. One party noted a number of mollusks which failed to contract after steaming. They seemed to be flat in the shell which opened with ease. They felt that these shellfish were not good and discarded them.

Several batches of mussels involved in the poisoning cases were carefully examined at the laboratory. Many of the shells were heavily parasitized by sponges. Every one of the laboratory staff who opened the fresh and living mollusks noticed a *peculiar, pungent, nauseating odor* which was particularly marked in the highly poisonous mussels removed directly from the rocks near Point Reyes. Control specimens from Long Beach and shellfish collected during the past nine months failed to emanate the same odor. One is therefore justified in considering the irritating odor of toxic mussels resembling spoiled meat infusion as abnormal. Although Virchow and Schmidtman<sup>16</sup> had noticed that the poisonous living specimens of *Mytilus edulis* which were responsible for the Wilhelmshafen cases had an odor resembling putrid sardines, this distinctive feature is not mentioned by any of the other writers on mussel poisoning. The mantle of the toxic mussels was always thick, and the orange coloring of the males appeared slightly deeper in tinge and furnished a golden yellow occasionally slightly greenish, alcoholic extract; but subsequent comparisons showed that this condition is dependent on the spawning period and is not a constant characteristic of poisonous shellfish. However, *the digestive gland (liver) of the highly toxic mollusks was always enlarged, dark greenish and friable*. Already in 1827 Coldstream (see Combe<sup>8</sup>) expressed the opinion that the liver of the harmful mussels is diseased, darker in color and increased in size. Wolff,<sup>17</sup> Schmidtman,<sup>16</sup> Netter and Ribadeau-Dumas<sup>15</sup> made the same observation and the view that the "liver" is the toxin-producing organ reappears in every important paper on mussel poisoning (Fiesinger and Ravina<sup>18</sup>). A series of sections prepared from toxic

<sup>16</sup> Ztschr. f. Med.-Beamte, 1888, 1: 19 and 49. See also reference (10).

<sup>17</sup> Arch. f. path. Anat., 1886, 103: 187; 1887, 110: 376.

<sup>18</sup> Ann. de. méd., 1925, 17: 235.

mussels fixed in bichloride mixtures showed, when compared with non-toxic specimens of the same or later seasonal periods, that the tubules of the digestive gland possessed a loose structure, the lumen being filled with faintly tinged chyme and numerous desquamated cells. The cylindrical "liver cells" invariably revealed a vesicular cytoplasm rich in enterochlorophyll and eosinophilic granules. These observations are now the subject of further study with special microchemical staining methods.

*Toxicological findings.* In order to determine the poisonous properties of the mussels involved in the outbreak and subsequently in order to conduct comparative toxicological studies several procedures have been developed. At first, pieces of the raw or cooked shellfish or broth were fed to kittens. Some of the animals died within twenty to ninety minutes after the ingestion of the material. Following a period of restlessness which would last from five to fifteen minutes the cats became quiet, resting their heads on the floor of the cage. From time to time they attempted to get up and although they showed sufficient strength in the fore limbs the posterior part of the body was paralyzed and they fell over on one side. At this stage the respiration was labored; a few convulsive movements passed over the body and finally a few gasping inspiratory motions of the mouth preceded a quiet death. Paresis and dyspnea lasted for several hours if only a few cubic centimeters of fish broth were fed. Involuntary passage of urine always occurred in these instances. The similarity of the symptoms with those of curare poisoning is rather striking. The autopsies always revealed collapsed purplish tinged lungs with the thoracic cavity in an inspiratory position, an empty urinary bladder and congestion of the abdominal viscera.

Rabbits and guinea pigs are rarely susceptible on feeding but can readily be poisoned by subcutaneous injections. Dogs invariably vomited after the forceful administration of broth or of pieces of mussel and therefore never absorbed enough poison to cause symptoms. Relatively large doses were required to provoke reactions following subcutaneous inoculation.

For comparative tests a very susceptible animal was found in the white mouse. Experiments extending over months have shown that 0.2 cc. of an extract of mussel harmful to human beings will, on feeding



through a fine silver catheter, produce characteristic symptoms and occasionally death. *Shellfish of low toxicity never furnish extracts which poison mice on feeding but only on subcutaneous injection.* Approximately a forty times larger dose is required to poison a mouse per os than by the subcutaneous route.

The method of feeding was originally chosen in order to detect any toxin which might act on the intestinal mucosa. It was soon found that only the paralytic poison was present in the aqueous and alcoholic extracts. A mouse, for example, fed with 0.5 cc. of raw juice pressed from a shellfish gathered at Point Reyes would show 30–60 minutes after the feeding a wobbling gait, twitching of the head, and poor orientation as if blinded. Paralysis of the hind legs or sometimes clumsy movements of the extremities are observed; then labored respiration sets in until finally the animal rests flatly on the floor of the cage. When touched the reflex response is strong and when held by the tail tip the animal gives the so-called "whirl test."<sup>19</sup> This reaction which is never given by mice intoxicated with the botulinum poison is most marked when the mussel toxin is absorbed slowly. The finer physiological disturbances may then be studied in every detail. They may persist for 18–28 hours or they may disappear within three to five hours and a gradual but complete recovery take place. *Recovered mice may again be poisoned.* In the fatal feeding intoxications, the collapsed dark lungs and the empty urinary bladder were regularly observed. The intestinal tract aside from a slight injection of the mesentery was invariably normal. Following the subcutaneous injection of a few drops of extract the course of events is much more rapid and a mouse receiving 0.1 cc., which gives transitory symptoms on feeding, may be dead within two or three minutes. Clonic or spastic convulsions, sometimes resembling anaphylaxis, or a few gasping dyspneic movements may be the only signs of the action of the toxin. The time required to poison fatally a 20-gram mouse depends entirely upon the amount of toxic material introduced subcutaneously and thus the M.L.D. of an extract can be estimated. For

<sup>19</sup> A normal mouse when suspended by the tip of the tail immediately assumes a rigid bat-like posture; the four extremities are stretched out ready to rest on the toes as soon as the body is nearing the cage floor. Mice poisoned by mussel extracts have lost all muscle tonus and the limbs hang flabbily on the body, but when held perpendicular the entire trunk spins in rapid motions around the fixed tip of the tail.



example, an aqueous extract of mussels from Dillon's Beach gave the following results:

Mouse 1—0.5 cc. extract subcutaneously, dead 2 minutes  
Mouse 2—0.1 cc. extract subcutaneously, dead 3 minutes  
Mouse 3—0.05 cc. extract subcutaneously, dead 15 minutes  
Mouse 4—0.01 cc. extract subcutaneously, recovered, symptoms

Rats can be used in place of mice; both rodents are equally susceptible to the mussel poison. Two types of extracts have been used in the animal tests. The mollusks are pulped with sand in a mortar mixed with an equal part of salt solution. The suspension is placed in the refrigerator and the raw juice extract is tested or it is boiled for ten to fifteen minutes in a water bath, filtered through paper and then fed or injected. Comparative tests have shown that this method of preparation extracts the major portion of the poison. For chemical studies alcoholic extracts as originally advocated by Salkowski<sup>20</sup> and Thesen are used. They are evaporated in vacuo to dryness and one part is dissolved in ten parts of sterile water. Later in the course of the studies which aimed at an elucidation of the periodicity of the poisonous properties of coast mussels it was found that not every mussel was toxic and that the extracts would frequently give irregular results. The method of Schmidtman<sup>16</sup> was therefore chosen. The digestive glands were carefully dissected with sterile instruments and one or several "livers" were placed en masse in a small subcutaneous pocket made on the back of a rabbit. Typical paralysis and even death after 12-18 hours were seen in a number of these rodents (rabbits) treated in this manner.

It appears unnecessary to detail the many tests which have been made in the course of the last nine months. The essential comparative data are summarized in table 2. Animal tests proved in every instance the exceedingly high toxicity of the mussels involved in the July poisoning cases. There are definite indications, however, that this property was not uniform and not of the same degree in the various mussel beds. This observation may in part explain the high intoxication rate with a low mortality (see map). A standard extract

<sup>20</sup> Arch. f. path. Anat., 1885, 102: 578.

(0.05 cc.) prepared with mussels from Dillon's Beach (23 cases; no death) was fatal to a mouse in fifteen minutes while the same quantity of rawjuice from shellfish gathered at Pedro Point (14 cases, 2 deaths, 14 per cent mortality) killed in three minutes. Probably every mussel was poisonous, although the tests along this line are not sufficiently numerous to draw final conclusions. Equally incomplete are the data on the distribution of the poison in the mussels. In two experiments the "liver" was considerably more toxic than the mantle tissue, but in two additional tests the differences were not striking. It is noteworthy in this connection that Wolff<sup>17</sup> originally considered the digestive glands of *M. edulis* the primary focus of the poison. As a rule the animals injected with the "liver" extracts in 5-15 times smaller doses developed symptoms much quicker and with greater regularity than those treated with the mantle or foot.

Since the epidemiologic survey had shown a wide distribution of the harmful shellfish it appeared of interest to know if some of the intermediary areas were affected or if the mussels of the entire coast were poisonous. Samples were secured from as far south as Long Beach and as far west as the Farallone Islands. The feeding tests on mice separated the highly toxic from the moderately toxic batches. The specimens from the Farallone Islands, Pacific Grove, etc., killed only on subcutaneous injection, those from Long Beach and San Francisco Bay were negative. In other words, *in July the mussels at localities along the entire coast as far south as Pacific Grove and even on the Farallone Islands in the open Pacific Ocean were toxic.* However, it must be emphasized that in the latter area and in Monterey Bay the poison was present only in amounts which would not produce an intoxication in human beings. The views of Jourdain<sup>21</sup> who in 1891 concluded that *Mytilus* and even the oyster always contain "ptomaines" in quantities which are rarely ever sufficient to be injurious, are only in part supported by the California data, since it is proven beyond doubt that such places as, for example, the San Francisco Bay and Long Beach shore line furnished non-toxic mussels even during the month of July. It is therefore justifiable to conclude that the factor or factors which induced or promoted the toxicity of the shellfish, although operating in *the open ocean and not in the stagnant waters of a harbor as has previously*

<sup>21</sup> Compt. rend. Acad. d. sc., 1891, 112: 106.

TABLE 2  
*Toxicity of mussels in California in July 1927*

LOCATION	DATE OF COLLECTION	MICE				OTHER ANIMALS
		Aqueous extracts		Alcoholic extracts		
		Feeding	Subcutaneous injection	Fatal doses intraperitoneally	M.L.D.	
Monterey—Pacific Grove	July 21	Heated extract 0.5 cc.  No symptoms	1 cc. fatal 9 minutes  0.5 cc. symptoms only	(a) 0.02 cc. fatal 17 minutes 1.0 cc. fatal 4½ minutes (b) 0.5 cc. non-toxic		
Pescadero	July 17	Cooked 0.5 cc. symptoms in 3 hours Raw juice: no symptoms	0.05 cc. fatal ½ minute Raw juice 0.1 cc. fatal 15 minutes; cooked extract 0.5 cc. fatal 3 minutes	0.01 cc. fatal in 8 minutes		
Tunitas Pedro Point	July 17 July 15	Raw juice: symptoms 2 hours 0.5 cc. symptoms 45 minutes; recovery	0.5 cc. fatal 10 minutes 0.05 cc. raw juice fatal 3 minutes	0.5 cc. fatal 5 minutes		Kitten fed 4 mussels. Fatal less than 2 hours
Rockaway Beach	July 17	Cooked 0.05 cc. symptoms in 2 hours; recovery	0.05 cc. fatal 5 minutes			
Princeton	July 25	Raw juice: no symptoms Heated extract: symptoms within 45 minutes	0.1 cc. fatal 12 minutes 0.1 cc. fatal 3 minutes			
Musselrock	July 17	(a) 0.2 cc. (5 mice each) symptoms 1-2 hours 3 dead in 18 hours (b) Raw juice 0.5 cc. symptoms 2½-3 hours (c) Cooked juice: symptoms 2 hours	0.05 cc. fatal 2 minutes 0.05 cc. fatal 8 minutes	(a) 0.01 cc. fatal 7 minutes (b) 0.05 cc. fatal 5½ minutes 0.005 cc. fatal in 14 minutes	Less than 0.5 mgm. Per os approximately 20 mgm.	Kitten fed ½ mussel. Symptoms 35 minutes. Dead 42 minutes Guinea pig 0.2 cc. subcutaneous. Dead 15 minutes Rabbit ditto

Cliff House	July 18	0.5 cc. raw juice: no symptoms; cooked, symptoms		0.005 cc. fatal 14 minutes 0.001 cc. fatal 34 minutes	
San Francisco Bay	July 22	Cooked and uncooked ( <i>Mytilus edulis</i> )			
Hunters Point	July 22	0.5 cc. negative Cooked and uncooked ( <i>Mytilus edulis</i> )	0.5 cc. negative		
Farallone Islands	July 23	0.5 cc. negative Raw juice 0.5 cc. no symptoms Extract: no symptoms	0.3-0.4 cc. negative 0.4 cc. fatal 10 minutes 0.5 cc. symptoms	1.0 cc. non-toxic 0.5 cc. fatal 8 minutes	
Point Reyes	July 22	(a) Raw juice: severe symptoms 35 minutes; recovered after 3 hours Boiled 1 hour; 0.3 cc. no symptoms (b) Raw juice 0.5 cc. symptoms 1-2 1/2 hours Fatal 2 1/2-4 hours Cooked 0.5 cc. symptoms 1 hour; recovery (c) Unheated extract: no symptoms Heated: symptoms 45 minutes; recovery	0.4 cc. fatal in 3 minutes	0.06 cc. fatal 6 minutes	Kitten fed 1 mussel. Fatal 20 minutes Rabbit fed 1/2 mussel. Fatal 8 hours
Tamales Bay	July 27	Extract: symptoms 5 hours Extract heated: symptoms 5 hours	0.1 cc. fatal 1 hour; 0.5 cc. fatal 5 minutes 0.1 cc. fatal 30 minutes		
Dillon's Beach	July 17	(a) Raw juice 0.5 cc. no symptoms (b) Extract 0.2 cc. symptoms within 40 minutes.	0.4 cc. fatal 5 minutes 0.05 cc. fatal 15 minutes		



TABLE 3  
*Periodic examination of mussels on California coast: 1927, 1928*

LOCALITIES ARRANGED GEOGRAPHICALLY FROM SOUTH TO NORTH	DATE 1927	TOXICITY FOR MICE (AQUEOUS AND ALCOHOLIC EXTRACTS)	DATE 1927	TOXICITY FOR MICE AND RABBITS (AQUEOUS EX- TRACTS AND DIGESTIVE GLAND TRANSPLANTATION)	DATE	TOXICITY
Monterey: Pacific Grove	July 21	0.2 cc. alcoholic extract fatal 17 minutes 1.0 cc. aqueous extract fatal 9 minutes	July 23	0.5 cc. non-toxic	November 11, 1927	0.5 cc. alcoholic extract symptoms; recovery
Pescadero (11 cases, no death)	July 17 and July 25	0.5 cc. fatal 5 minutes 0.01 cc. alcoholic extract fatal 8 minutes	August 27	0.5 cc. negative	—	—
Tunitas (5 cases, no death)	July 19	0.5 cc. raw juice fatal 10 minutes	September 1	0.5 cc. fatal 7 minutes Glands toxic (rabbit)	—	—
Pillar Points (6 cases, no death)	—	—	September 1	Glands non-toxic (rabbit)	—	—
Moss Beach (1 case, 1 death)	—	—	September 1	0.5 cc. negative Glands toxic (rabbit)	October 5, 1927	3 digestive glands sub- cutaneously, non-toxic (rabbit)
Montara (12 cases, no death)	—	—	September 11	0.5 cc. fatal in 4 days Glands non-toxic (rabbit)	—	—
Princeton	July 25	0.1 cc. raw juice fatal 3 minutes	September 1	0.5 cc. fatal 15 minutes Glands toxic (rabbit)	—	—
Pedro Point (14 cases, 2 deaths)	July 15	0.05 cc. raw juice fatal 3 min- utes	August 29	0.1 cc. fatal in 2½ hours	—	—
Rockaway Beach (12 cases, 1 death)	July 17	0.05 cc. fatal 5 minutes	September 1	0.5 cc. fatal 60 minutes	—	—
Mussel Rock (5 cases, 1 death)	July 17 and July 26	0.05 cc. fatal 5 minutes 0.001 cc. alcoholic extract fatal 7 minutes	August 29	0.5 cc. fatal 5 minutes 3 glands non-toxic (rabbit)	—	—
Cliff House	July 18	0.005 cc. alcoholic extract fatal 14 minutes	September 1	Glands non-toxic (rabbit)	February 11, 1928	1 cc. alcoholic extract; not toxic
San Francisco Bay: M. <i>edulis</i>	July 23	0.4 cc. extract negative*	August 14	0.5 cc. fatal 44 minutes	—	—
			September 14- 26	0.5 cc. alcoholic extract non-toxic	—	—

Farallone Islands	July 23	0.4 cc. raw juice fatal 10 minutes	—	—	—	—
Point Reyes (8 cases, 1 death)	July 22	0.05 cc. heated extract fatal 10 minutes	August 12	0.1 cc. no symptoms	December 12, 1927	0.5 cc. alcoholic extract non-toxic
		0.06 cc. alcoholic extract fatal 6 minutes		Glands toxic	March 29, 1928	0.8 cc. alcoholic extract fatal in 5 minutes
Tamales Bay	July 27	0.1 cc. raw juice fatal 30 minutes	—	—	—	—
		0.5 cc. raw juice fatal 5 minutes				
Dillon's Beach (23 cases, no death)	July 17 and July 21	0.05 cc. heated extract fatal 15 minutes	September 7	0.5 cc. fatal 1 hour	—	—
		0.4 cc. raw juice fatal in 3 minutes		Glands toxic		
Long Beach	August 2	0.5 cc. extract negative	—	—	—	—

\* Raw juice diluted 1:1 with salt solution.

*been the case in every outbreak thus far reported*, affected an extensive yet limited area with a varying degree of intensity.

The histories previously discussed justified the suspicion that the mussels may develop their toxic properties within a few days. This naturally suggested that they might lose the poisonous qualities in a relatively short time. It was impractical to make periodical tests of all the beds, but the data which have been collected and summarized in table 3 are sufficiently conclusive. In the course of six weeks the toxicity dropped to one-tenth of the original M.L.D. The mussels of some beds become non-toxic or contained the poison in such small amounts that only the subcutaneous transplantation of several "livers" produced typical symptoms in rabbits. By the end of October and the early part of November the shellfish were free from poison and have remained in this state with the exception of those gathered on the 29th of March, 1928, at Point Reyes and early in May, 1928, near Eureka. The slight toxicity previously demonstrated in the concentrated alcoholic extract of mussels collected on the Farallone Islands and other places in July, 1927, has again been observed. As already outlined, a continuous examination of certain readily accessible beds during the coming summer will give comparative data regarding the periodic fluctuations in the poisonous properties of *Mytilus californianus* on the coast. They alone may help to explain the sudden development of mussels which are harmful to man. Schmidtman<sup>16</sup> as well as Wolff have noted that the toxicity of the mussels in the harbor at Wilhelmshafen was a temporary condition which existed in 1885 until December, then passed off until April, 1886, reached its highest peak in August and had diminished in October only to reappear again in September, 1887. Repeated tests during the preceding winter and as late as the month of July had invariably furnished non-toxic extracts. Since characteristic clinical cases of human mussel poisoning in 1880 and again in 1883 had already been noted Schmidtman<sup>16</sup> expresses the belief that a general poisoning of the shellfish may occur at regular intervals of from two to three years. The Santa Cruz cases in 1915 and again in 1917 suggest that such conditions may also prevail on the Pacific Coast. Thesen and more recently Netter and Ribadeau-Dumas also have published data on the periodic toxicity of sea mussels. At Calais, for example, the

mollusks were injurious in May, but in July only the extract of 80 digestive glands fatally poisoned one mouse in 60 minutes.

Paralytic mussel poisoning has been observed in the months of May,<sup>2</sup> June,<sup>3</sup> July,<sup>2</sup> August,<sup>3</sup> September,<sup>3</sup> and October,<sup>2</sup> but never during the winter months.<sup>22</sup> One cannot escape the impression that this seasonal occurrence may in some way be associated with the spawning period of the mollusks which begins in the European waters about the middle of April and early part of May and continues until the middle of July. According to Daniels<sup>23</sup> sporadic spawning may occur during October and November. It is not yet known when the Pacific Coast mussels spawn; some believe that it takes place as early as April or May, but Rankin<sup>24</sup> found at San Diego that the mussels certainly were not in spawning condition before the latter part of July. On the Atlantic coast Field<sup>25</sup> secured spawning individuals every week throughout the season from June 20 to September 15. Every toxic mussel examined in California during the month of July and even late in August and September was engorged with spawn. Therefore, one cannot agree with Fiessinger and Ravina<sup>18</sup> who conclude that all the poisoning outbreaks occurred outside the spawning period.

*Prevention.* The same principle as was used in Leith in 1828 where the "magistrates with propriety issued a warning against the use of mussels" was also followed by the California State Department of Health. Immediately after the first fatalities of mussel poisoning had been reported the Department issued a state-wide warning against the use of coast mussels and promulgated an order forbidding the sale of mussels. Subsequently, certain mussel beds in the San Francisco Bay were examined and since laboratory tests proved the shellfish non-toxic the quarantine measures were lifted. In May, 1928, the sale of mussels collected on the coast was only permitted for two small areas in San Diego and the vicinity of Monterey.

#### MUSSEL TOXIN

*Bacteriological tests.* Portions of toxic and non-toxic mussels were cultured aerobically and anaerobically and some of the enrichment

<sup>22</sup> Netter and Ribadeau-Dumas included in their table several cases which unquestionably were not caused by the paralytic mussel poison.

<sup>23</sup> 30th Rep. Lancashire Seafood Lab., 1922, p. 207.

<sup>24</sup> California Fish and Game, 1918, 4: 113.

<sup>25</sup> Bull. Bureau of Fisheries, 1921-1922, 38: 186.



cultures were tested for poisons with negative results. As a rule a few Gram-positive and -negative cocci and fine Gram-negative rods developed on the plates seeded with the tissue lymph from the digestive glands. By comparison no differences could be detected between the poisonous mussels and numerous non-toxic specimens. In fact, the normal flora of the mollusks was in no way disturbed by the acquired toxicity and remained practically the same throughout the entire period of observation. Toxin-producing anaerobes of the botulinus class were never found. In the light of these results it appears unlikely that the mussel poison is due to a specific bacterium as proposed by Lustig,<sup>26</sup> McWeeney,<sup>27</sup> Griffiths,<sup>28</sup> and others. Potato cultures of the Gram-positive bacterium isolated by Lustig when fed to guinea pigs and rabbits produced fatal choleraform diarrhea. The typical nerve neurotoxic disturbances have not been noted. Other investigators, Grawitz and Wolff<sup>10</sup> and Schmidtman,<sup>16</sup> Thesen<sup>12</sup> and Netter and Ribadeau-Dumas<sup>15</sup> have isolated various types of bacteria but they failed to find a microorganism which was specific for the poisonous mollusk. Furthermore, the suddenness with which the invertebrates of large areas exposed to the open ocean became toxic speaks against the conception that the factor is an infective agent. Our knowledge concerning the diseases of invertebrates is, however, so meager that one should avoid generalizations which are merely based upon analogy deductions.

*Chemistry.* Ordinary ethyl alcohol was found sufficient to extract most of the poison from the ground-up shellfish; the natural water content of the mussels and the addition of a few drops of hydrochloric acid seem to increase the yield.

Evaporation on the water bath in neutral or slightly acid solution does not harm the toxin. As a rule, however, evaporation is done in a vacuum. Sodium carbonate at room temperature for a few hours has no effect on the mussel toxin; at water-bath temperature it destroys the poison completely in a short time. The dry slightly hygroscopic mussel extract keeps unaltered for six months, even when exposed to the air.

<sup>26</sup> Arch. per le sc. med., 1888, 12: 323; Arch. ital. d. biol. Turin, 1888, 10: 393.

<sup>27</sup> Brit. Med. Jour., 1890, 2: 628.

<sup>28</sup> Chem. News, 1890, 62: 17.

Mussel toxin dialyses readily through collodion impregnated fish bladders (14 per cent in 5 hours at 37°, more than 50 per cent in 48 hours). A Berkefeld candle allowed the toxin to pass unaltered while approximately only 50 per cent of the toxic substance passed a Cramer candle. The loss is probably due to the alkaline reaction of the filter, since the fluid reacted alkaline to litmus after passing this candle.

Solubility tests were performed with the crude alcoholic extract, either evaporated to dryness or in slightly acid watery solution. The poison is insoluble in ether, chloroform, ethyl acetate, n-butyl alcohol and toluol. None of the fat solvents mentioned extract the toxin from carbonate alkaline solutions. It is only slightly soluble in boiling butyl alcohol, but readily so in boiling 96 per cent ethyl alcohol. It dissolves with difficulty in the latter when cold. It is also slightly soluble in absolute acetone, but completely so in 80 per cent acetone. Methyl alcohol is a still better solvent for the poison, showing differences of solubility at different temperatures similar to ethanol. Water and glacial acetic acid are excellent solvents. Hydrochloric acid promotes solubility in the alcohols.

Making use of the solubility properties mentioned, several samples of mussel extract were purified. In two cases the end product consisted of a small amount of a mixture of amorphous and crystalline substances. One was identified with Betain hydrochloride (atoxic). Another substance consisting of fine white needles is not identical with Betain-HCl, but is the hydrochloride of another base. Its toxicity could not be established exactly due to lack of material and its persistent adsorption of some amorphous substance.

Regarding the chemical nature of the poison nothing definite can be concluded from these experiments. The properties of solubility, however, and the close association with Betain speak in favor of a quarternary (or possibly tertiary) amine. The absence of protein and carbohydrate is proven by the negative color reactions, the absence of lipoids by the solubilities.

*Potency.* Due to the small amounts of purified material available quantitative toxin tests have not as yet been made. The most potent residue of an alcoholic extract kills a mouse on intraperitoneal injection of 0.5 mg.; per os approximately 20 mg., or approximately a dose 40 times greater, are required for a mouse of the same weight. The

M.L.D. for mice of the pure substance may be estimated as not larger than 0.1 mg. on intraperitoneal injection.

In so-called "atoxic" mussels (mussels which proved harmless when consumed by human beings or when fed to laboratory animals in the form of extracts) roughly 100 times less poison was demonstrated than in the most toxic specimens which were connected with the poisoning cases in July, 1927. The poison of these mussels shows the same solubilities as the active substance isolated from the harmful shellfish. The purification of "atoxic mussel" extracts leads to an accumulation of the poison in certain fractions, but so far the yields were not sufficiently concentrated to furnish one M.L.D. for a mouse when introduced by mouth.

Since Thesen was unable by Brieger's method to identify the poison with the *mytilotoxin*, less drastic methods of isolation than the precipitation with acetate of lead and bichloride of mercury were chosen. The data thus far available lend no support to the belief that the mussel poison as found on the California Coast is identical with the mytilotoxin of Brieger.<sup>29</sup> In fact, the value must be seriously questioned, of the test recommended by this investigator to prove the poisonous character of mussels by the liberation of a nauseating odor which develops by boiling the hydrochloric acid extract of the shellfish with some sodium hydroxide. The fact that other amines (Ackermann<sup>30</sup>) regularly present in the bivalves may give the same reaction supports this contention. Further research on this subject is in progress.

*Origin.* How the mussels acquire their poisonous qualities is still a theoretical matter. Popular opinion has attributed the production of the poison to various sources.

(1) Some think it is due to the absorption of copper salts from the rocks or pilings. Others believe that the poison comes from the little crab, *Pinnotheres maculatum* or *pisum*, which lives in the mantle cavity. It has also been attributed to the byssus and to parasites such as sponges and starfishes growing on the shells. These views are without foundation since some of these conditions are also found in the

<sup>29</sup> Deutsch. med. Wchnschr., 1885, 11: 907; Arch. f. path. Anat., 1888, 112: 549; 1889, 115: 483.

<sup>30</sup> Zentralbl. f. Biol., 1922, 74: 67; 1924, 80: 193.



non-toxic mollusk. These old theories should be definitely abandoned. The objects on which the mussels grow have no influence upon their toxicity.

(2) Post-mortem changes or autolysis have with some justification been suspected as the possible source of the poison. Although to a certain degree the toxicity of stored mussels must be admitted, it is definitely known and amply proven by laboratory and field studies that the toxic bivalves were absolutely fresh and living. Moreover, it was shown that decomposition decreases the toxicity and finally destroys the poison entirely. Then again the harmful substances which appear in asphyxiated mollusks only after the fifth day are non-toxic except in large doses and they are as a rule removed by cooking or steaming for a few minutes. On the other hand, even boiling for 60 minutes does not materially detoxify a highly potent slightly acidified extract containing the paralytic poison.

(3) Influence of the surroundings: Schmidtman, Thesen, Netter and Ribadeau-Dumas and others believed that *toxic mussels are found only in certain restricted localities* where the water is in a stagnant condition, and that if removed to the open freely circulating water of the sea they lose their poisonous qualities in less than four months. On the other hand, if harmless mussels are transferred to stagnant zones they, too, become toxic. This suggested that some injurious agent was present in the stagnant water which was taken up by the mussel and stored in the digestive gland. To test this, Thesen placed some mussels in weak solutions of strychnine, curare and the poison of mussels. Although he found that at the end of a certain time these poisons were taken up by the liver, the experiments are by no means convincing. This theory on the effect of the surroundings is not supported by the California observations. It must be remembered that the mussels exposed to the open sea were poisonous while those kept in estuaries of rivers and the San Francisco Bay never possessed the least degree of toxicity even in areas which were extensively polluted. Sometimes mussels directly in contact with highly poisonous bivalves were found to be harmless. Moreover, the toxicity varied and disappeared irrespective of the fact that the conditions of the surroundings remained generally the same.

(4) Most writers concluded that the toxicity of the mussels is *the*



result of an actual disease from which the mollusks are suffering. The bacteriological studies conducted by a number of workers lend, however, little support to the contention that this disease is caused by bacteria which lodge in the liver. Mussel poisoning is not due to the direct action of bacteria nor to their toxins but is the result of a promptly acting thermostable poison which has all the properties of a "sex poison." The most plausible explanation is probably that the mussels suffer from a transient metabolic disease (or structural disease—Combe<sup>31</sup>) which may be influenced by the surroundings, but the actual cause of which remains unknown. The observations of Lindner<sup>31</sup> and the more recent studies conducted at the Scripps Institution for Oceanography at La Jolla suggest that possibly the food (certain dinoflagellates) may be one of the factors responsible for the disease.

(5) The crude poison resembles chemically and pharmacologically the Fugu poison which, according to Tahara<sup>32</sup> and Twakawa and Kimura,<sup>33</sup> is usually found in the gonades and the liver of certain Tetrodon or toad fishes. According to Strohl<sup>34</sup> it is suspected that the formation of this potent cryptotoxin is intimately connected with the sex metabolism of the fishes. It is not unlikely that similar disturbances in the metabolism may be responsible for the basic toxicity of coast mussels during certain periods of the year. However, this assumption does not explain the sudden appearance of highly poisonous bivalves at irregular intervals of many years. A potent toxin pharmacologically similar in its effect to the mussel poison is formed by another mollusk, *Conus geographicus*. Concerning its function or origin nothing definite is known (Fredericq<sup>35</sup>). Continuous observations and more extensive chemical and physiological metabolism studies, and not deductions from analogy, are required in order to solve the problem of mussel poisoning

<sup>31</sup> Centralbl. f. Bakteriol., 1888, 3: 352; Ber. d. Vereins f. Naturkunde z. Kassel, 1889, 34/35: 47.

<sup>32</sup> Biochem. Ztschr., 1911, 30: 255-275.

<sup>33</sup> Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., 1922, 93: 305-331. See also Phisalix, "Animaux Venimeux," Paris, 1922, 1: 590.

<sup>34</sup> "Die Giftproduktion bei den Tieren," Leipzig, 1926, p. 30. See also Pawlowsky, E. N.: Gifftiere, Jena, 1927, p. 414.

<sup>35</sup> Handb. d. vergl. Physiol., 1924, 2: 2 Hälfte, p. 75.

## SEROLOGIC TYPES OF CLOSTRIDIUM TETANI

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California  
Medical School, San Francisco*

GEORGE E. COLEMAN AND JANET B. GUNNISON

Based on the specificity of the agglutination reaction numerous microbic species have been differentiated into various types or groups. While the clinical picture of the disease caused by the different types of a given bacterial species may be the same, or very similar, this differentiation of the causative organism into types has been of inestimable value in the study of the etiology and epidemiology of the disease and particularly of its vaccinal or serum prophylaxis and therapeutics.

With this idea in mind Tulloch<sup>1</sup> during the World War began anew the study of the bacteriology and serology of *Cl. tetani*. He was able to differentiate the organism into four serologic types. He furthermore investigated the proportion of the different types in the war wounds of those receiving prophylactic serum injections and concluded that future successful serological prophylaxis probably would be dependent on a greater extension of the knowledge of types which he had thus far gained.

The serological investigation of *Cl. tetani* has since been continued by several workers, notably by Fildes,<sup>2</sup> Bauer,<sup>3</sup> TenBroeck and Bauer,<sup>4</sup> Bauer and Meyer<sup>5</sup> and Coleman and Meyer.<sup>6</sup> These studies have had to do largely with the determination of the proportion of the various types of *Cl. tetani* isolated from various sources, principally from the feces of man and the agglutinating titer of the different types found in normal human serums. Owing to the importance of this question it would seem that a brief historical review of the sources and the proportion of the various types thus far isolated in different parts of the world and of those used at present in our studies in this laboratory would not be without interest.

After the isolation by Tulloch of four types from war wounds in France a strain of *Cl. tetani* was sent to him from France which would not agglutinate in any of his four serums. This type was found only once. Cultures of these five

Received for publication, Jan. 28, 1928.

1. J. Hyg., 1919, 18, p. 103.
2. Brit. J. Exper. Path., 1925, 6, p. 91.
3. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1924, 21, p. 265.
4. Ibid., 1925, 22, p. 562.
5. J. Infect. Dis., 1926, 38, p. 295.
6. Ibid., 39, p. 332.

types were sent by him to Bauer and TenBroeck in China in 1921 and 1923. Type 1 was labeled "U. S. A. II" and was the strain used in the United States in the production of antiserum. Type 2 was labeled "T. 67," type 3, "T. h. 22 d.," and type 4, "118 Nogouchi." The strain which Tulloch received originally from France was named type 5 by TenBroeck and Bauer. This proved to be the predominant type found by these workers in China. They also isolated strains of two new types from human and guinea-pig stools and named them 6-227 and 6-167 and 7-309 and 7-128. Cultures of all of these strains except that of type 5 have been received by us through the courtesy of these workers.

During a survey by Bauer and Meyer of human carriers of *Cl. tetani* in California, three strains were isolated which will not agglutinate with any of the seven type serums prepared from the cultures mentioned and which we have named type 8 (3, 41, 43). The cultural characteristics of these three strains were studied by Coleman and Meyer<sup>7</sup> comparatively with two type 1 cultures and no essential differences were found between any of them.

Recently one of us isolated from the hillside soil on the site of this institution a strain of *Cl. tetani* which is agglutinated to full titer by none of our eight serums and with which we have prepared an agglutinating serum. We have marked this strain "IX E" and consider it to be a type 9. The strain is motile,

TABLE 1.—AGGLUTINATION REACTIONS

Anti- gen	Serum 1	Serum 2	Serum 3	Serum 4	Serum 5	Serum 6	Serum 7	Serum 8	Serum 9
1	1:3,200+	—	—	—	—	—	1:800+	—	—
2	—	1:6,400+	—	—	—	—	—	—	—
3	—	—	1:12,800+	—	—	—	—	—	—
4	—	—	—	1:1,600+	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	1:12,800+	—	—	—	1:200+
6	—	—	—	—	—	1:3,200+	—	—	—
7	1:400+	—	—	—	—	—	1:3,200+	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	1:3,200+	—
9	—	—	—	—	1:1,600+	—	—	—	1:1,600+

Serums 1 to 5 prepared by Dr. J. Bauer, serums 6 to 9 prepared by Miss J. B. Gunnison.

liquefies gelatin but does not produce indol and is an average toxin producer as are all of the above mentioned strains.

With the exception of type 5 which was isolated from a patient (feces?) with beriberi in China these are the type cultures used by us in the preparation of antigens for our type determinations. We have typed several other strains isolated in this laboratory from feces, post operative cases, wounds, etc.

In order to study their serologic relationship agglutination tests have been carried out using serums and antigens prepared from each of the nine type strains. The results of these tests are given in table 1.

It will be seen that in only two instances does cross agglutination between our types occur. TenBroeck has observed (personal communication) a marked cross reaction between types 1 and 7 which our results confirm. Our type 9 strain reacts with type 5. Tulloch<sup>1</sup> stated that there was no cross reaction between types 1, 2, 3 and 4 and this was confirmed by Bauer.<sup>3</sup> Fildes,<sup>2</sup> however, noted cross agglutination between types 2 and 3 and between types 4 and 5. It seems possible

that in some instances the occurrence of cross reactions might be due to the presence in the cultures of more than one type.

Absorption tests were made with the strains showing cross reactions and by this method the types were proven to be distinct (table 2). Reciprocal absorption tests were also carried out with two of the strains designated type 8, since by this method alone can strains be positively identified. It was found that absorption of the serum agglutinins of either type 8 strain, with the antigen of either, removed the agglutinins for both; thus proving them to be identical.

Bauer<sup>3</sup> and Fildes<sup>2</sup> have referred to the spontaneous agglutinability of type 3. We have worked with several strains of this type and have never observed the slightest tendency of this or any other type

TABLE 2.—ABSORPTION REACTIONS

## TYPE 1 AND TYPE 7

Antigen Tested	Type 1 Serum Absorbed with		Type 7 Serum Absorbed with		Unabsorbed Control Serums	
	Type 1	Type 7 (309)	Type 1	Type 7 (309)	Type 1	Type 7 (309)
1	1:80+ 1:160—	1:3,200+	—	1:400+	1:3,200+	1:800+
7 (309)	1:400+	—	1:3,200+	1:80+ 1:160—	1:400+	1:3,200+
7 (128)	1:400+	—	1:3,200+	—	1:800+	1:3,200+

## TYPE 5 AND TYPE 9

Antigen Tested	Type 5 Serum Absorbed with		Type 9 Serum Absorbed with		Unabsorbed Control Serums	
	Type 5	Type 9	Type 5	Type 9	Type 5	Type 9
5	1:160+ 1:320—	1:12,800+	—	1:100+	1:12,800+	1:200+
9	1:1,600+	—	1:1,600+	—	1:1,600+	1:1,600+

to agglutinate spontaneously. Young cultures of certain strains may flocculate slightly while growing in broth but saline suspensions prepared from such growths do not clump spontaneously. This is in marked contrast to the observation of Fildes<sup>2</sup> and of Bauer<sup>3</sup> that young broth cultures showed less tendency toward spontaneous agglutination than did saline suspensions.

Regarding the known types of Cl. tetani it may be of interest to resume in tabulated form the proportion of the various types found by the workers previously cited (table 3).

In Tulloch's early work with the war wounded in France, with the exception of finding type 5 once, he was able to include all of the strains isolated within four groups. In England, according to Fildes, type 5 predominates. In China seven types have been isolated and thus far



TABLE 3.—TYPES OF CL. TETANI FOUND BY VARIOUS WORKERS

	1		2		3		4		5		6		7		8		9		Number of Strains Studied
	Times Found	%	Times Found	%	Times Found	%	Times Found	%	Times Found	%	Times Found	%	Times Found	%	Times Found	%	Times Found	%	
Results Obtained by																			
Tulloch from war wounds in France.....	60	47.2	25	19.7	35	27.5	5	3.9	1	0.8	0	0	0	0	0	0	0	0	127
Tulloch: fecal cultures in England.....	9	75	2	16.6	1	8.3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	12
Fildes: feces of man and horses, soil, wounds, cases of tetanus, etc., in England .....	13	17.3	6	8	14	18.6	3	4	39	52	0	0	0	0	0	0	0	0	75
Bauer, Tang, Yü and TenBroeck*: cultures of feces of man and domesticated animals in China.....	21	8	17	6.5	52	19.9	1	0.4	155	59.3	10	3.8	5	1.9	0	0	0	0	261
Bauer and Meyer in California.....	78	65	9	7.5	21	17.5	3	2.5	6	5	0	0	0	0	3	2.5	0	0	120
Coleman and Meyer†: agglutinations at 1:40 or higher of 104 normal human serums in California.....	4	3.8	5	4.8	0	0	0	0	11	10.5	0	0	0	0	0	0	0	0	104
Coleman: isolated once from soil.....	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
Stock cultures in this laboratory collected by Heller <sup>8</sup> from different laboratories in the United States were typed by Bauer and Meyer. These cultures have been isolated in this country from sources other than feces and are used in some institutions for the production of commercial antitoxin .....	18	90	0	0	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20

\* These and preceding data are cited by Bauer and Meyer.

† These results are given as being of interest on the assumption that the individuals furnishing these serums at one time probably harbored tetanus spores. Of these 104 serums 89% showed agglutinins at 1:10 or higher. One serum agglutinated as many as 5 types. Many of them<sup>9</sup> or more types. 35.5% of all agglutinations were of type 2 and 46.7% type 5. Type 8 was found 4 times at 1:10 dilution. No serum tests were made for type 6 and 7 as they were not found in stools. Forty-four of these serums were tested for antitoxin with negative results.<sup>8</sup> J. Infect. Dis., 1922, 30, p. 18.

in California the same number (types 6 and 7 have not been found). Whether other types exist we do not know but in all probability a complete survey in this and in other countries of the types obtained from wounds, feces and soils will disclose other types. That this survey should be made for various regions is of the utmost importance if, as we are tentatively assuming, the control of the tetanus problem should ultimately depend upon a more extensive knowledge of as many types as possible. Added weight will be given to this suggestion when it is remembered that type 5 was found only once in France and appears to be the predominating type in China and in England.

#### CONCLUSION

Evidence is given that there are at least nine distinct serologic types of *Clostridium tetani*.









## EXPERIMENTAL INFECTION WITH SPORES OF *CL. TETANI*—TETANUS V.\*

BY GEORGE E. COLEMAN.

(Received for publication June 1, 1928.)

The fact that billions of detoxified spores of *Cl. tetani*, free from other bacterial species usually may be inoculated into laboratory animals without causing symptoms of tetanus gives evidence of the inherent difficulties in experimental work with this organism. These spores develop in the animal body, so far as is known, only in partially or wholly devitalized tissue. Therefore, experimental methods for initiating or accelerating this development depend for success upon the addition of some accessory factor having this end in view. This is accomplished by injecting either before, with or after the spores other bacterial species or their toxins or particulate or chemical substances having irritating properties.

It is most likely that any infected lesion of the body would be contaminated by more than one bacterial species and that in the vast majority of cases the substances which promote tissue destruction and thus enable tetanus spores to germinate in a wound are probably generated rather by other organisms than by the sterile necrosis or autolysis of traumatised tissue. The first desideratum in these studies should be the determination of the least number of spores of *Cl. tetani* which will infect under any given condition simplified as far as possible.

In reviewing the literature preparatory to some investigations on the prophylaxis of tetanus I have been impressed with two outstanding observations: the enormous number of spores used by most investigators and their failure to use an adequate number of control animals. Disregarding for the present the differences which we know exist between the infective and toxogenic properties of different strains of *Cl. tetani*, the development of a sufficient number of spores to produce symptoms is far more apt to take place when a comparatively large number is injected with a favorable tissue debilitant. And yet the

\* From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California Medical School, San Francisco, Cal.

Acknowledgment is made of the courtesy of Dr. H. E. Foster of the Cutter Laboratory, Berkeley, California in supplying the concentrated antitetanus globulin used in my studies.

experience of other workers who have used counted spores has been that, in general when infection with several thousand (in my experience several hundred) to several million spores takes place at all, the time before the onset of symptoms and death, if it occurs (usually 3-4 days), varies only to a comparatively slight extent regardless of the number of spores injected. On the other hand, as I shall show later, of the very few unprotected guinea pigs (20) into which I have injected 60 spores or less, and which died of tetanus, the average time of death was  $6\frac{1}{3}$  days; however, 11 of these animals died in 3 or 4 days. Of 14 unprotected guinea pigs which received from 5 to 11 spores, some of which may have escaped in the serous fluid shortly after injection or have been non-toxic, the time of death averaged 5.8 days. It is therefore evident that natural infection and the cumulative effect of sufficient toxin to cause symptoms or death may be and probably are produced originally by an exceedingly small number of spores.

The ideal of all workers in this field has been to simulate natural infection as far as possible and it is unthinkable that it is ever produced by the billions of even thousands of spores which many of them have used. Judging from the methods set forth by Francis (1) in contaminating vaccine virus artificially and by my own experience in concentrating tetanus spores from cultures he probably used in excess of a billion spores for each experimental animal. Armstrong (2) also working with vaccine virus "rubbed in a heavy suspension of a virulent strain." It is realized that these workers were merely using animal inoculation as a possible method for testing naturally contaminated vaccine virus. Tulloch (3) who used counted spores "found it necessary" with his strains to inject 2,000 million bacilli and 100-1,000 million spores. He currently used 200-400 million in his experiments. Wolff-Eisner (4) devised a method of dosable infection with sterile earth contaminated with tetanus spores. Unfortunately the details of his method were not given. TenBroeck and Bauer (5) were able by their special method to employ only 1,000 and report two instances in which they caused tetanus in guinea pigs with 160 spores. They assume that the blood of animals which harbor tetanus spores in their intestinal tract is apt to contain antitoxin and that these animals are infected with greater difficulty. Fildes (6) in comparative studies with various strains of *Cl. tetani* and in his later work (7) used the opacity method with saline suspensions which means that from one to several hundred million were injected. In the present study, some of the protocols of which will be given later, as already stated, I have been able to cause fatal infection many times with less than 10 spores.

It would almost seem that failures in experimental studies of serum prophylaxis based upon the methods of other workers of producing infection would seem of doubtful value as applied to tetanus in human beings, especially as most investigators assume that man is vastly more susceptible to the disease than laboratory animals.

The injection of very large numbers of spores with any favorable tissue debilitant often fails to produce tetanus in some animals whether they are intestinal carriers or not. On this account I am convinced that the majority of workers have hitherto used too few controls, especially in protection experiments. In spite of the oft reiterated statement that the control animals, frequently only one or two, "invariably die," I have found by a check on some of these methods with larger numbers of animals that many of them invariably live. In fact, I have found it almost impossible to kill individual guinea pigs with a few hundred tetanus spores injected at different times with several of the different methods. One guinea pig was given rattlesnake venom, then 500 spores into the lesion. No symptoms of tetanus were produced. Then living staphylococci and 500 more spores were given. A large abscess formed but tetanus did not develop. Another guinea pig which survived the injection of 500 spores following a saponin injection was given 500 more spores and 1 grain of quinine without showing symptoms. This animal was a non-carrier of tetanus and was subsequently infected by another method. This dose of the same strain usually killed guinea pigs. For an illuminating discussion of the idiosyncrasy of test animals, infecting doses of spores, their infectivity and toxogenic properties, the time element, tissue debilitants and other interesting questions the reader is referred to the monumental work of Tulloch on tetanus already cited. No other investigator with whose work I am familiar appears to be so cognizant of the various difficulties and limitations inherent in the problem.

#### EXPERIMENTAL.

##### *The storage of tetanus spores.*

It is probable that the effect produced by tetanus spores of any given strain may vary according to the media in which they are grown, the period of incubation, the different manipulations they have undergone, their age and the media in which they have been stored. We have therefore adopted a standard method for the preparation of the spores of the different types used by us which is as follows: All our spores were recovered from a 6 day growth at 37°C. in large flasks of



peptic digest beef heart media capped with vaseline. The cultures after being thoroughly shaken were centrifugalized at slow speed for 10 minutes to throw down the grosser particles of beef heart. The spores in the supernatant fluid were concentrated by centrifugalization and the supernatant liquid poured off. Sufficient spores were then added with a spatula to sterile sand to give a count of several million per gram. The sand was heated to 60° C. for 1½ hours to drive off the moisture, kill the vegetating forms and destroy the toxin. It was then thoroughly mixed, placed in sterile bottles of colored glass with tightly fitting rubber stoppers and stored in the dark at laboratory temperature.

All of our spores were prepared from the same batch of media within a day or two of each other and are approximately the same age. For each experiment one half gram of sand was weighed and the desired dilutions made in saline. Tests have shown that the vegetating forms are killed, that saline emulsions of the spores are non-toxic and that high dilutions do not contain microscopically visible detritus or meat particles. Tests for purity are also made. The spores are not reheated before using. In more recent work with these stored spores and those in naturally contaminated dried earth held at laboratory temperature some evidence has been obtained of a decrease in infectivity after several months. The viability, however, appears to change but slightly.

Counts of the number of viable spores for each experiment are made from the actual suspensions injected into guinea pigs at the time of such injections. The technic for these counts has been given in my article (8) on the infectivity of spores of *Cl. botulinum* and will not be repeated in this paper.

#### TISSUE DEBILITANTS.

Experience has shown that the standardization of an ideal method for infecting all animal species with tetanus spores is unattainable as they react differently to different substances. As guinea pigs for many reasons are the animal of choice in this work I have for the most part confined my studies on tissue debilitants to these animals.

Except in special investigations the concurrence of other bacterial species or their toxins having a cumulative generalized effect upon the system should be avoided. To obtain clear cut and dependable results in the study of the prophylaxis or cure of tetanus we should first eliminate as many variable factors as possible; those which are known are sufficiently complex and inconstant. However, as a matter of interest owing to the promising lead given by Francis (1) in his work

with staphylococcus I conducted a few experiments along the lines indicated by him.

A brief review of some of my preliminary attempts to infect guinea pigs with *Cl. tetani* follows:

*Staphylococcus*. Though two virulent strains of *staphylococcus aureus* were used, for the most part my results with 50,000 type I virulent spores were very inconstant. I also experimented with killed cultures of staphylococcus hoping thus to produce abscess formation by the nucleo-proteins which they contain. This attempt was unsuccessful as well.

I had recently isolated a very virulent type III strain of *Cl. tetani* from a human uterus (post abortum). It therefore seemed worth while to attempt to infect guinea pigs with a mixture of this organism and staphylococci injected into the muscles surrounding the vagina and the rectum. Results were negative.

*Staphylococcus and Cl. sporogenes Mixed*. Only one trial which was unsuccessful.

*Ox Bile*. As ox bile has been shown by some workers to increase the permeability of the intestinal mucosa it was fed to six fasting guinea pigs. Only one was a carrier of *Cl. tetani* (type III). Twenty million type I spores (low infectivity) were fed  $4\frac{1}{2}$  hours later. No symptoms of tetanus resulted. Cultures of the stools were positive after 16 days and negative after 37 days.

*Diphtheria toxin* (intra and subcutaneously) was tried with negative results.

*Rattlesnake venom* was once injected intramuscularly also without success.

*Burns*. The animals were etherized and a deep burn made with a hot spatula. Immediately or 24 hours later 250-1,000 type I spores (low infectivity) were injected all around and into the wound which was covered with vaseline or collodion. Negative results. Seven animals were burned on the skin with crystals of carbolic acid and 27,000 virulent type I spores injected into the wound immediately and 24 hours later. Two animals developed symptoms on the 10th day and died after 11 days.

*Sterile earth* was ground in a mortar sufficiently fine to pass through an 18 gauge needle. Fifty thousand type I virulent spores (0.5 cc.) were added to 0.5 cc. of a 10 per cent suspension of this earth and injected intramuscularly into four guinea pigs without producing tetanus. Russell (9) has shown that the quantity of earth in a suspension plays a rôle in the development of tetanus. A type IX

strain of *Cl. tetani* was later isolated by me (10) from this sample of earth. A piece of wire so cut and filed along the sides as to produce tearing of the tissues when inserted was covered with this sample of moistened raw earth and then inserted with a rotary motion into the muscle of the legs of two guinea pigs. Tetanus did not develop. A saline suspension of this raw earth caused tetanus in 12 out of 12 guinea pigs when injected with saponin.

Stall sweepings received from Zürich, Switzerland which contain the spores of *Cl. tetani* as well as those of several other pathogenic anaerobes were used by me to infect guinea pigs by the method employed by Berwick whose results have not yet been published. This sample was rubbed into a cut in the muscle of the back and the wound closed with sutures. Results were almost uniformly successful. However, 1 cc. of a 0.5 per cent suspension of this material in saline did not cause tetanus when injected following saponin.

*Quinine Hydrochloride with and without urethane.* Guinea pigs vary greatly in their susceptibility to quinine. My results with this drug were also very inconstant though in most instances tetanus spores previously injected and lying dormant in the tissues were activated.

*Starch-aleuronat mixture.* After so much unfruitful labor in my attempt to devise a uniform method for infecting guinea pigs I was greatly cheered to read the explicit details given by TenBroeck and Bauer in their work with this mixture and of their "invariably" successful results with 1,000 spores. I therefore tried a few series of experiments which with our strains unfortunately failed to confirm their work. The details as given by them were followed closely except as to the use of guinea pigs which were known to be intestinal non-carriers and free from circulating antitoxin. Some of my later tests make me doubt that the *natural* carrier state plays any important rôle in experimental infection, at least when tissue debilitants are used. The same may be said of the injection of small quantities of air under similar circumstances. The protocols of the experiments with starch-aleuronat are given in Table I.

Three animals were injected intraperitoneally with 3 cc. of A-S. mixture. Twenty-four hours later 50,000 spores in NaCl were injected into the muscles of two animals and into the peritoneal cavity of one. No symptoms. Phagocytosis of some of the spores.

Some experiments were made with spores of different types diluted in A-S. mixture and in saline and injected after saponin or formalin to determine if the A-S. hastened or retarded the development of symptoms. It apparently had no effect.

TABLE I  
*Spores of Cl. tetani suspended in 3 per cent aleuronat-starch mixture (1 cc.) spores heated 20 minutes at 70° C.*  
*Type I—Strain C.*

Weight of guinea pig	Number of spores	Route	Symptoms	Death	Remarks
253 gms. ....	10 million	Subcutaneously and intramuscularly	Tetanus 2 days	Night 3 days	This strain is weakly infective by all methods
277 " .....	10 million	Intramuscularly	Tetanus 2 days	Night 3 days	
343 " .....	20,000	"	None 3 weeks	—	
330 " .....	2,000	"	None 3 weeks	—	
289 " .....	1,000	"	None 18 days	—	
320 " .....	20,000	"	None 18 days	—	
355 " .....	1 million	"	None 27 days	—	
302 " .....	1 million	"	None 27 days	—	
332 " .....	1 million + antiserum	"	Tetanus 15 days	16 days	

<i>Type I—strain TMC</i>					
348 " .....	7.65 million (in NaCl)	Intramuscularly	Tetanus 11 days	Recovered	5-8 spores of this strain infect by another method
372 " .....	1.09 million	"	Tetanus 4 days	5 days	
350 " .....	109,000	"	None	—	
323 " .....	54,600	"	"	—	
392 " .....	27,300	"	Tetanus 4 days	Recovered	
378 " .....	1,100	"	None	—	

<i>Type V spores</i>					
Used guinea pigs which had received no antiserum	1,000	Intramuscularly	None	—	5-11 spores of this strain infect by another method
	1,000	"	"	—	
	200	"	"	—	
	200	"	"	—	
	1,000 in NaCl	"	"	—	
	1,000 in NaCl	"	"	—	
	200 in saponin	"	Tetanus 2 days	3 days	



*Saponin.*

A reference to Tulloch's use of saponin was brought to my attention. I did not know at that time the quantity he injected so I determined by experiment that 0.2 cc.-0.25 cc. of 0.8 per cent saponin dissolved in freshly boiled water and injected into the muscles of guinea pigs a few hours before the spores gave the best results. This dose corresponds very closely with the dose used by Tulloch (3). I found, however, that more constant successes follow the use of freshly dissolved saponin which I do not sterilize as our sample is free from tetanus spores. By the use of this substance I have been able to infect guinea pigs with 200 spores of *Cl. tetani*.

Contrary to the findings of Tulloch I was able frequently to infect mice by this method, though their high susceptibility to the poisonous properties of this drug involves the loss of too many animals to make its use with this species practicable. The injection of 50-175 type V spores following an injection of 0.06 cc. of 0.8 per cent saponin produced tetanus symptoms and death within 1 to 8 days in 8 out of 17 mice. Some of these mice dying of tetanus had received antiserum which merely delayed the onset of symptoms and time of death.

A large number of protection experiments using 1,000-10,000 spores of different types\* were carried out with saponin as a tissue debilitant but I found that about 15 per cent of a total of over 50 unprotected guinea pigs failed to contract tetanus. Without discussing some of the possible reasons for this, except to say that it is largely due to the differences in susceptibility of the tissues of guinea pigs to its destructive action, it is evident that as a means of initiating the development of tetanus spores saponin does not fulfill all the requirements of experimental infection with *C. tetani*.

## FORMALIN.

Martin H. Fischer (11) has made a thorough study, including histological examinations of the effects of formalin injected by various routes into animals. A perusal of his paper led me to believe that, though many of the objections to which saponin is subject would be encountered, the result of the use of formalin as a tissue debilitant in work with *Cl. tetani* might prove to be more constant.

Preliminary experiments were therefore undertaken and the maximum dose which can be injected with safety into the muscles of guinea pigs was determined. This proved to be, according to the weight of

\* The type II strain used was isolated by Tulloch in his early work on serological types.

the guinea pigs, 0.6 cc.-0.8 cc. of a freshly prepared 10 per cent solution of formalin (40 per cent). Formalin is highly toxic for all animals and especially for rats and mice. Doses which cause any considerable destruction of the tissues of these latter animals are apt to prove rapidly fatal. They appear, however, to vary more in their susceptibility than do guinea pigs. The maximum dose for large rats should never exceed 0.4 cc. of a 10 per cent solution. Its use with small rats and mice is not recommended. I have not studied the effects of tetanus spores following formalin injections into rats. My experience with this species was gained in the course of infection experiments with *Cl. botulinum* (8).

Formalin as a tissue debilitant has one major objection which saponin does not possess and that is the unavoidable exudation of serous fluid from the point of needle puncture which sometimes occurs during and after the injection of spores and occasionally the escape of fluid from the surface oedema which sometimes appears a few hours after the injection of the formalin. Undoubtedly a number of spores if injected within this period may be lost in this way. In spite of this and perhaps because the oedema favors infection, even with a small number of spores tetanus results far more regularly with formalin than with saponin.

Another objection to the use of formalin is the occasional progressive destruction of tissue almost at times simulating the effect of infection with *Cl. histolyticus*. After 10 days or more the leg bone may become exposed and the wound infected with cocci and bacillary species. This delayed concurrent infection does not seem to favor the development of tetanus spores, for if symptoms do not appear in unprotected guinea pigs in 4-5 days they usually do not appear at all. Conceivably tetanus infection might take place from the material in the cage. Tetanus has never developed in my formalin controls regardless of the extent of the infection from cage material or of tissue destruction. I have lost very few animals due to the infection of lesions with other contaminants. The usual picture found at autopsy after 3-4 days is a small scab on the surface and deep in the muscle an area of necrosis sometimes difficult to find. A smear made from this material and examined in the microscope generally reveals no sporulating forms of *Cl. tetani* except when a large number of spores has been injected. Bacilli resembling vegetating forms of *Cl. tetani* are frequently seen and occasionally cocci or other contaminants. Often the necrotic tissue in the depth of the wound is microscopically sterile.

TABLE II.  
*Injection of formalin and spores of Cl. tetani (1 cc.).*  
*guinea pigs 350-450 grams.*

Number of spores	Type	Formalin	Symptoms	Death	Remarks
1,500.....	III-U	1 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	3 days	Formalin 4 days before spores
1,500.....	"	0.5 cc.-1 per cent	None	—	Formalin 24 hours before spores
1,500.....	"	0.5 cc.-1 per cent	Tetanus 1 day	2 days	Formalin 24 hours before spores
600.....	III-U	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	3 days	Formalin 24 hours before spores
600.....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 3 days	4 days	" " " "
600.....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	3 days	" " " "
600.....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	4 days	" " " "
600.....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	4 days	" " " "
600.....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	4 days	" " " "
600.....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	4 days	" " " "
600.....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	4 days	" " " "
<i>Guinea pigs 200-250 grams.</i>					
1,000.....	III-U	0.5 cc.-5 per cent	Tetanus 6 days	14 days	In the majority of animals in this series
1,000.....	"	Mixed with spores	None	—	no formalin lesions were apparent.
500.....	"	"	Tetanus 2 days	3 days	Spores of all surviving animals later
500.....	"	"	Tetanus 5 days	6 days	reactivated with quinine
180.....	"	"	None	—	
180.....	"	"	None	—	
86.....	"	"	None	—	
86.....	"	"	Tetanus 18 days	Recovered	
25.....	"	"	None—abscess	Killed	
25.....	"	"	None	—	
8.....	"	"	None	—	
8.....	"	"	Tetanus 7 days	18 days	

TABLE II (Continued).

Number of spores	Type	Formalin	Symptoms	Death	Remarks
1,040 .....	III-U	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 3 days	4 days	Ten animals in this series 100 per cent
100 .....	I-TMC	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 7 days	8 days	Serous fluid from wound + for mice
100 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Not noted	3 days	
45 .....	V	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 4 days	4 days	
45 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 5 days	5 days	Slight formalin lesions—spores in wound Slight formalin lesions—bacilli in wound Slight formalin lesions—bacilli in wound
9 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 5 days	6 days	
45 .....	IX-E	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 3 days	11 days	
45 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Not noted	12 days	Tetanus doubtful—wound scrapings to mouse which died in night. Pneumococci in blood
5 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Not noted	11 days	
4,500 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 3 days	4 days	
450 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 3 days	6 days	Serous fluid + + + for mice Thread-like bacilli in wound Slight formalin lesion
45 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Not noted	6 days	
5 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Not noted	3 days	
700 .....	III-U	0.7 cc.-10 per cent	Not noted	2 days	Scrapings wound mice + + + Nearly 100 per cent
140 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	None	—	
70 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 3 days	4 days	
7 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Tetanus 2 days	3 days	
7 .....	"	0.7 cc.-10 per cent	Not noted	3 days	



Usually injections of formalin are made 24 hours before the spores (1 cc.) but equally favorable results are obtained when it is injected only 3 hours before or with large numbers of spores even at the same time. In order to favor the destruction of a large area of tissue and prevent as far as possible the liquid from spreading along the areolar septa between the muscle sheaths a few drops of both the formalin and later the spores are injected deeply into different areas in the leg muscle with but a single insertion of the needle through the skin. I usually scrape the bone slightly with the point of the needle during both injections.

I have not yet injected as many animals with formalin as with saponin but the constant results (practically 100 per cent) with 100-6,000 spores and the frequent production of tetanus with fewer spores made it seem worth while to report the method at this time. The protocols of these experiments are given in Table II.

In addition to the experiments given in Table II, 19 animals which had shown no symptoms of tetanus following quinine, killed staphylococcus suspensions or dilute formalin, developed tetanus and died after receiving 0.7 cc. of 10 per cent formalin 24 hours before the injection of a mixture of quinine and 500 type III spores. I have been unsuccessful in the use of formalin alone (0.7 cc. of 10 per cent) as an activator of tetanus spores previously injected with either dilute formalin or saponin.

#### INFECTION DELAYED BY ANTISERUM.

Many animals receiving few spores particularly of type IX-E died suddenly without symptoms of tetanus having been noted, though often serous fluid or scrapings from the wounds of these animals produced tetanus in mice. It occurred to me that as the effect of the toxin is probably cumulative, death could be delayed and symptoms definitely put in evidence by the injection of tetanus antiserum. This proved to be the case and from this and other evidence we may reasonably conclude that tetanus toxin caused the death of all but one of the animals shown in Table II in which no symptoms were noted. The protocols of the experiments undertaken for this purpose are shown in Table III.

#### COMPARATIVE INFECTIVITY OF TYPES.

No accurate studies appear to have been made with the idea of testing actual differences in the infectivity of the different types of spores. As I had been successful in producing tetanus with relatively few spores and as the production and maintenance of our different

type spores were under strictly comparable conditions I have begun some experiments with the hope of throwing some light on this question. Results were inconclusive with the first two strains tried. This may have been due to individual susceptibility of our guinea pigs to formalin, and in some cases to the exudation from the wound of some of the few spores (8-11) injected. Also it is possible that there may have been practically no difference in the infectivity of the two types studied. It is evident from this and previous work that such a few spores will not regularly produce infection with this method.

TABLE III.

*Infection with spores of Cl. tetani—formalin and antiserum, 0.7 cc. of 10 per cent formalin 24 hours before spores to all guinea pigs 1 cc. of type IX-E spores, 0.1 cc. of serum (1600-1800 units per cc.) SBC, 24 hours before spores.*

Number of spores	Serum	Symptoms	Death	Remarks
6,000.....	—	Not noted	3 days	Opisthonos at death
6,000.....	Yes	Tetanus 6 days	10 days	
600.....	—	Not noted	4 days	Opisthonos at death
600.....	—	Not noted	3 days	Opisthonos at death
600.....	Yes	Tetanus 6 days	10 days	
600.....	Yes	Tetanus 6 days	11 days	
60.....	—	Not noted	3 days	Wound scrapings mouse +++ and tetanus spores in smear
60.....	—	Not noted	4 days	Wound: thread-like bacilli
60.....	Yes	Tetanus 6 days	9 days	
60.....	Yes	Tetanus 6 days	10 days	
7.....	—	Not noted	4 days	Opisthonos. Wound scrapings (1:10,000) mouse +++
7.....	Yes	Tetanus 5 days	Recovered	
Formalin alone 1 cc...	—	None 3 weeks	—	Usual lesions
Formalin alone 1 cc...	—	None 3 weeks	—	Leg dried up and sloughed off to 2d joint

The question of the infectivity of different strains will have to be decided by the injection of larger numbers, perhaps in some cases many thousands of spores as well as by the use of a larger number of animals. I have a type I strain which infects only with several thousand spores. Saponin was used to accelerate the infection. This

strain develops a moderately potent toxin and is used by a commercial laboratory to produce antitoxin. In these comparative tests 0.05 cc. of the antiserum used theoretically should protect guinea pigs against at least 85,000 M.L.D. of toxin. Its failure to prolong the time of death of the animals which developed tetanus gives evidence of the toxogenicity of these few spores. The protocols of the first of these comparative studies are given in Table IV.

TABLE IV.

*Comparative infectivity of spores of Cl. tetani types I TMC and type V, 0.8 cc. of 10 per cent formalin to all guinea pigs 24 hours before spores, 0.05 cc. of antiserum (1700 + units) 1 hour before spores.  
8 type I—TMC spores diluted in NaCl.*

Weight	Symptoms	Death	Remarks
392.....	None	—	Tetanus somewhat doubtful
260.....	None noted	11 days	
322.....	None	—	

*8 type I—TMC spores diluted in aleuronat-starch emulsion.*

366.....	Tetanus 3 days	4 days	Large abscess in leg
290.....	Tetanus 4 days	5 days	
325.....	None	—	

*8 type I—TMC spores in NaCl + serum.*

360.....	Tetanus 5 days	6 days	
315.....	None	—	
336.....	Tetanus 4 days	5 days	

*11 type V spores diluted in NaCl.*

380.....	None	—	Severe abscess
280.....	Not noted	2 days	Spores in wound—washings + for mice
325.....	Not noted	3 days	Spores in wound—washings + for mice

*11 type V spores diluted in aleuronat-starch emulsion.*

365.....	Tetanus 3 days	3 days	
300.....	None	—	
333.....	None	—	

*11 type V spores in NaCl + serum.*

370.....	None	—	Smears negative. Washings wound + for mice
302.....	None	—	
355.....	Not noted	4 days	

## DISCUSSION.

As already pointed out the ideal adjuvant to infection with *Cl. tetani* is one which acts under conditions simplified as far as possible. The action of such tissue debilitants as saponin and formalin would fulfill this condition to some extent could contamination of the wound with other organisms surely be prevented. For this purpose Tulloch suggests drying the skin with alcohol and applying collodion after injecting the spores. When I used collodion following burns, within a day or two the edges curled up and contamination followed so I did not attempt its use with formalin.

Tulloch has pointed out the objection to the use of such a substance as saponin and suggests that protection experiments are difficult to interpret when infection takes place in a nidus of widely destroyed tissue. He believes in this case that the spores "develop in a situation essentially *outside* the body," probably grow with extreme rapidity and are protected from the body fluids. He is of the opinion that under such conditions no intimate contact can take place between the living tissues and the organism as a whole wherein the reaction to infection might prevent the disease. It would seem, however, that if the seat of infection is in a sufficiently fluid condition to allow the blood or nerve tissues to absorb toxin from it, the body fluids containing protective substances could very readily reach and combine with the toxin in situ, and if these were in sufficient quantity neutralize it there. My use of antitoxin in delaying infection in some cases would tend to confirm the correctness of this supposition. This is far more apt to be true with the use of formalin, for with this debilitant when infection takes place at all, it certainly often begins in tissue thoroughly bathed in serous fluid. Russell (9) has made histological studies of the local fate of tetanus spores in the muscles of guinea pigs and the subsequent development of the spores and resporulation. With calcium chloride as a debilitant she states that "the oedema subsided to a considerable extent in the later stages but was never absent." Inasmuch as tetanus symptoms developed the second day in some of her animals it is evident that considerable oedema must have been present in the necrosed tissue in which germination was initiated.

The outstanding picture presented by these studies with formalin is the early development of the spores before any considerable part of the muscle becomes coagulated or "fixed." I have already shown that infection with spores of *Cl. botulinum* induced by an injection of formalin follows a course as to the onset of symptoms almost parallel



with that of *Cl. tetani* and it is not unusual to find the botulinus organisms in tissue bathed in exudate so liquid that it pours from the wound when incised. I admit, however, that the proteolytic properties of this organism may be responsible to a certain extent for this condition. Therefore, as our ultimate aim is the standardization of a method for the infection of as many guinea pig controls as possible in protection experiments against *Cl. tetani*, I do not feel that the use of such a tissue debilitant as formalin presents inherent difficulties against which cogent objections can be raised.

Regarding conditions which favor the germination of spores there is but little doubt that the extent and particularly the *character* of the tissue destruction plays an important part. Fildes (7) states that "the degree of vegetation depends upon the violence of the debilitant and that with a feeble debilitant only a very small proportion of the total mass of spores in a lesion germinate. A variable proportion of the spores which do not germinate are not enclosed in phagocytes." He is therefore of the opinion that if any protective action is exerted by phagocytosis in tetanus it would probably operate by destroying the accompanying contaminants and so prevent necrosis. Furthermore, basing his opinion on positive results obtained with intraperitoneal injections, he believes that the activity of phagocytes might even favor germination since a great concentration of these cells becomes a veritable abscess with resultant necrosis and its effect on oxygenation. The successful results, which I was unable to confirm, reported by Ten-Broeck and Bauer (5) with starch-aleuronat might tend to bear out this supposition. Fildes contends that spore germination is not determined by phagocytosis but *in vivo* (as *in vitro*) solely by the tension of oxygen in the medium in which they lie and which in necrotic areas may fall to zero.

It will always be impossible to eliminate the factor of animal susceptibility to chemical or other irritants but provided a sufficient number of controls is used, this objection can be greatly overcome. I feel that with formalin as an ancillary substance for the development of *Cl. tetani* spores in the body of guinea pigs a nearer approach has been made to the problem, provided the injection of *too few* spores is not attempted. My results have shown that by this method, with strains of moderate infectivity, the routine injection of not less than 100 spores would probably infect in most cases.

In the few experiments I have made it would be futile to theorize as to why some strains (type IX-E) cause death so much more rapidly than others after symptoms, which, though not noted, probably

appeared. This is also a familiar picture with infection by the strain of *Cl. botulinum* which I have used, death frequently supervening within 2 hours after the first appearance of symptoms. According to Armstrong (12) the onset of symptoms in post vaccination tetanus occurs from 18 to 24 days subsequent to the vaccination and he remarks that many of the patients die within 24 hours after the appearance of symptoms. It is possible that this phenomenon is due to the extreme toxogenicity of individual strains.

We agree with Tulloch who believes that in protection experiments the setting of a time limit for the death of controls is important. Unless, as he says, a reasonably short period is established the experimental error may assume serious proportions owing to the number of controls which survive when the period between inoculation and onset of symptoms is lengthened. This period should be determined by a few preliminary tests and the 100 per cent infecting dose found with a minimum number of spores for each strain to be used. This dose will then constitute in a measure the M.L.D. for the spores of that particular strain at that time. With the use of formalin survival in animals which have once shown symptoms of tetanus is extremely rare.

#### CONCLUSIONS.

Guinea pigs may be infected with the spores of *Cl. tetani* more regularly by the use of formalin as a tissue debilitant than by other usual methods.

By the injection of formalin guinea pigs have been infected with approximately 5 spores of *Cl. tetani*.

#### *Bibliography.*

1. FRANCIS.  
1914. U. S. Hygienic Lab. Bull. No. 95.
2. ARMSTRONG.  
1927. U. S. Pub. Health Rep., 42, 3061-3071.
3. TULLOCH.  
1919. Jour. Hyg., 18, 103-202.
4. WOLFF-EISNER.  
1927. Deut. med. Wehnschr., 53 J., No. 3, 107-108.
5. TENBROECK AND BAUER.  
1926. Jour. Exper. Med., 43, 361-377.
6. FILDES.  
1927. Brit. Jour. Exper. Path., 8, 219.
7. FILDES.  
1927. *Ibid.*, 387-393.
8. COLEMAN, GEORGE E.  
1929. Amer. Jour. Hyg., 9, ?

9. RUSSELL.  
1927. Brit. Jour. Exper. Path., 8, 377-386.
10. COLEMAN, GEORGE E., AND GUNNISON, JANET B.  
1928. Jour. Infect. Dis., 43, No. 3 pp. 184-188.
11. FISCHER, MARTIN H.  
1901-1905. Jour. Exper. Med., 6, 487.
12. ARMSTRONG.  
1928. Jour. Am. Med. Assn., 90, 738-740.









4152

Cl. Botulinum Type D Sp. N.

K. F. MEYER AND J. B. GUNNISON.

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco.*

During the past year the laboratory has received several specimens of botulinus-like organisms through the courtesy of Drs. P. J. du Toit and E. M. Robinson, Onderstepoort, Pretoria, South Africa. Although these cultures differ in many ways from those isolated in this country, one strain secured from lamziekte carrion deserves special consideration.

The fluid portion of the original culture was toxic for mice. The antitoxic sera Type A, B and C failed to protect the animals against this poison irrespective of the fact that the symptoms and lesions were in every respect typical for botulism. A highly potent toxin was obtained in beef heart-peptic digest mash (1 cc. = 20,000 guinea pig M.L.D.) and Hibler's brain medium. Protection experiments with the known type antitoxins and a serum supplied by Dr. E. M. Robinson known as "*Cl. parobotulinum bovis antiserum*" were made on guinea pigs.

The results clearly indicate that the toxin of one of the South African strains of *Cl. botulinum* is different from either *Cl. botulinum* Type B and C or *Cl. parobotulinum* Type A and B.

In pure culture the organism resembles the anaerobe described by Theiler and Robinson.<sup>1</sup> It is a long, slender, Gram-positive, unusually pleomorphic rod which is actively motile under strictly anaerobic conditions. In egg-medium (Rettger) numerous subterminal closteridium-like spores are formed, while in beef heart and other

---

<sup>1</sup> Theiler and Robinson, *Z. f. Infektionskr. d. Haustiere*, 1927, xxxi, 165; 11th and 12th Reports of Director of Veterinary Education and Research, Dept. Agri., Union of S. Africa, 1927, II, 1099.

## CL. BOTULINUM TYPE D. SP. N.

media spores are rarely observed. Rhizoid, non-hemolytic surface colonies appear on properly prepared glucose blood plates. Growth is good and a small amount of gas is formed in beef heart, egg and milk media provided a vaseline seal is used. The proteolytic properties are low (Sörensen's figures 1st day 0.5, 14th day 4.0), about the same as the non-ovolytic Type B and slightly higher than the Type C strains.

The cultures have a strong odor of butyric acid. Indol is not produced. Glucose, levulose, sucrose, lactose, maltose, glycerine, inositol and galactose are fermented when the test medium is composed of 0.3% Liebig's extract, 0.5% Difco peptone and 1% carbohydrate. No gas is liberated, but the change in pH is marked. In many of the sugars a final pH after 4 days incubation is 4.6 to 5.0. *Cl. botulinum* Type D is the only strain thus far encountered which fails to produce gas from carbohydrate. It also differs from other strains in its action on sucrose and lactose. Toxic and non-toxic variants may be isolated from fluid cultures.

The susceptibility of various animals for the toxin is briefly as follows: Chickens and dogs are non-susceptible to subcutaneous injection of 100,000 guinea pig M.L.D.'s; 5 guinea pig M.L.D. subcutaneously are fatal to a rabbit in 72 hours; 1,000 M.L.D. for a rat in 7 days; 100,000 M.L.D. for a pigeon in 24 hours. Contrary to the observation of Theiler, mice are susceptible; a toxin which was fatal for guinea pigs in a dilution of 1:20,000 fatally poisoned mice in a dilution of 1:50,000. The ratio of the M.L.D. by subcutaneous injection to the M.L.D. *per os* is 1:1,000 for guinea pigs, 1:200 for mice and >1:3,000 for rabbits. Suitable suspensions of the *Cl. botulinum* Type D are not agglutinated by any of the type sera available in this laboratory but are readily clumped by a homologous antiserum.

The anaerobe isolated from lamziekte carrion is a non-ovolytic and non-sarcolytic organism which produces a highly potent neurotoxin. Pharmacologically the poison acts on small laboratory animals like the botulinum toxin. It is not neutralized by any of the known Type A, B and C antitoxins. The bacterium should therefore be designated *Cl. botulinum* Type D (Theiler and Robinson<sup>1</sup>) and should be definitely separated from the ovolytic *Cl. parabotulinum* Type A and B.







4153

Susceptibility of Macacus Rhesus Monkeys to Botulinum Toxin  
Type B, C and D.

J. B. GUNNISON AND K. F. MEYER.

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University  
of California, San Francisco.*

Thus far no cases of botulism due to *Cl. botulinum* Type C have been reported and nothing definite concerning the susceptibility of man to this toxin is known. On the other hand since the great susceptibility of monkeys to *Cl. parobotulinum* Type A toxin is now established through the studies of Dack and Wood<sup>1</sup> it appeared not unlikely that comparative tests on these animals with non-ovolytic and non-sarcolytic strains might permit of certain deductions concerning the liability of man to botulism poisoning by the ingestion of Type C and D toxins.

Such tests became imperative since Bengtson<sup>2</sup> considers the monkey very susceptible to the toxin of *Cl. botulinum* Type C and the reports of Theiler and Robinson<sup>3</sup> contain no information concerning the effect of Type D toxin on apes. A series of monkeys was therefore injected or fed by stomach tube with varying doses of different toxins.

The tests confirm the early observations of van Ermengem<sup>4</sup> and Römer and Stein<sup>5</sup> that monkeys are very susceptible to *Cl. botulinum*

---

<sup>1</sup> Dack and Wood, *J. Infect. Dis.*, 1928, xlii, 209.

<sup>2</sup> Bengtson, *Pub. Health Rep.*, 1922, xxxvii, 164.

<sup>3</sup> Theiler and Robinson, 11th and 12th Reports, Director of Vet. Educ. and Res., Union of S. Africa, Dept. of Agri., 1927, II, 1099; *S. African J. Science*, 1925, xxii, 141; *Z. f. Infektionskr. d. Haustiere*, 1927, xxxi, 190.

<sup>4</sup> Van Ermengem, *Z. f. Hyg. u. Infektionskrankh.*, 1897, xxvi, 1.

<sup>5</sup> Römer and Stein, *Arch. f. Ophth.*, 1904, lviii, 291.

## SCIENTIFIC PROCEEDINGS

Type B toxin (produced by a strain recently isolated from a ham in Germany) by feeding. In the animal poisoned by this type, toxin was demonstrated in the blood and throughout the entire intestinal tract but not in the brain. Although readily intoxicated by subcutaneous injections with Type C and D toxin the *Macacus rhesus* resist very large doses of the same poison *per os*. The first visible symptoms in the animals injected subcutaneously appeared only 60 to 90 minutes before death. Since the number of the experiments here presented is small, one may merely conclude that the susceptibility of man to Type D and in all probability to Type C toxins is low.





## INTRAMUSCULAR INFECTION OF GUINEA PIGS WITH SPORES OF *CL. BOTULINUM*.\*

By GEORGE E. COLEMAN.

(Received for publication June 1, 1928.)

It was shown by Coleman and Meyer (1) in 1922 that the spores of *Cl. botulinum* would germinate in the animal body. Guinea pigs were inoculated subcutaneously or intravenously with heated spores. Heated and unheated emulsions of the organs of those animals dying of botulism were inoculated into culture media. In many instances growth was obtained only from the unheated emulsion showing that it probably resulted from vegetating rods. Direct evidence was obtained of the germination of these spores and the multiplication of the rods in the closed jugular vein as well as in the anterior chamber of the eye of rabbits.

In 1923 I (2) showed that the heated spores of this organism suspended in salt solution would germinate and form toxin in collodion sacs placed in the abdomen of guinea pigs and rabbits and that the growth in these sacs was as luxuriant as if the spores had developed in a tube of suitable culture media. The toxin did not dialyse through the collodion membrane. This work has been confirmed by Starin and Dack (3).

Recently I have developed a method for infecting guinea pigs with spores of *Cl. tetani* by the use of formalin as a tissue debilitant. The animals were inoculated in the leg muscle with 0.6 cc.-0.8 cc. of a freshly prepared 10 per cent solution of formalin (40 per cent). A few hours later the injection into the same site of 1 cc. of saline containing less than ten heated spores of *Cl. tetani* produced local and generalized tetanus which caused the death of the animals. This has been repeated many times. An article describing these experiments is in this issue.

At the suggestion of Dr. K. F. Meyer I have employed the same technic with the heated spores of *Cl. botulinum* instead of those of *Cl. tetani*.

Coleman and Meyer (1) as well as many other workers have shown

\* From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California Medical School, San Francisco, Cal.

that millions of the heated spores of *Cl. botulinum* may be fed or inoculated subcutaneously or intravenously into guinea pigs without causing symptoms of botulism. Negative results are also obtained by the intramuscular route as the control experiments in the present work will show. By the use of formalin as a tissue debilitant I have been able to cause fatal botulism by the intramuscular injection of approximately 25 viable heated spores. It is even possible that some of these spores may have been non-toxic.

#### EXPERIMENTAL.

Spores of strain 62 type A as well as a type A strain isolated from a recent fatal outbreak of botulism due to canned corn were obtained from a 10 day growth of *Cl. botulinum* in casein-digest broth. The spores used had been in the ice box several weeks. A 1/100 dilution of the spores in salt solution (original counts 10-15 billion) was heated at 80° C. for 20 minutes. Further dilutions were then made and 1 cc. of each was inoculated into beef heart and deep agar. After 24 hours at 37° C. the number of colonies resulting from the growth in agar of the spores in the highest dilutions were counted. Those dilutions giving the approximate number of spores per cc. desired were then reheated and 1 cc. inoculated into the site in the leg muscle of guinea pigs (300-400 gms.) which had received from 3 to 22 hours previously 0.6 cc.-0.8 cc. of 10 per cent formalin. Immediately after the spore injections 1 cc. of several of the highest dilutions injected were diluted further if necessary and inoculated into each of 2 or 3 tubes of deep agar, held for 3 days at 37° C. and the average count obtained at the end of that time. In studies by various workers on the delayed germination of spores of *Cl. botulinum* the spores usually have been heated over a relatively long period at high temperatures while ours have been heated only to 80° C. Their studies show that the period of dormancy is shorter in agar than in other media. Taking the factor of "lag" into consideration and admitting that our counts are lower than would have been shown by the plate method we still feel that they are sufficiently accurate for the purposes of this study.

*Controls:* The experiments with strain 62 were controlled by the intramuscular injection of 35 million spores without a previous injection of formalin and of 3,160 spores given subcutaneously. Also one of three animals receiving 790 spores with formalin received type A antitoxin.

For the corn strain five animals were also given antitoxin. Coleman and Meyer (1) have shown that a saline suspension of very large numbers of heated spores of *Cl. botulinum* may become toxic after

emaining in the ice box over night. Therefore, even though there were relatively few spores in the suspensions inoculated and they were reheated prior to injection, additional controls were made with two heated spore suspensions (containing 500 and 37,500 spores per cc. respectively) which had been kept at laboratory and incubator temperature from 1 to 5 days. This forestalls possible criticism that the spores may have produced toxin by autolysis in the animal body.

All of the control animals in each series remained well with the exception of three of the guinea pigs receiving antiserum. Though two of these animals died with typical symptoms of botulism on the 13th and 17th days, in only one animal were rare sporulating forms demonstrated in the wound. Neither showed *Cl. botulinum* in the organs and the wound tissue was non-toxic for mice.\* This is a familiar picture in my work with tetanus spores in which animals which have received antiserum die after 2 weeks or more. It is generally possible in these cases to reveal toxin in the inoculated muscle. In the case of bacteria generating such potent toxins as those of *Cl. botulinum* and *Cl. tetani*, after the exhaustion or elimination of the injected antiserum it is evident that a very few organisms would produce sufficient toxin to cause death and it might be difficult by cultural or microscopic methods to reveal them.

The protocols of the experiments with *Cl. botulinum* are shown in Tables I and II.

After the onset of symptoms on the 3rd or 4th day the animals usually die within a very few hours (2-8). Inasmuch as some of the guinea pigs which had previously shown no symptoms died during the night, most of these animals were autopsied and smears were made from the tissue at the site of the injection and from the various organs. Each microscopic field of smears made from the wound material always revealed enormous numbers of rods and sporulating forms simulating a veritable culture. This is especially significant in those animals which received only 25 and 38 spores. Numerous spores and rods were occasionally found in the spleen but rarely in the other organs. The wounds were sometimes contaminated with cocci and other bacterial species. Occasionally growth occurs in a very restricted area in the necrosed muscle and unless smears are made from this area no organisms may be found.

\* Though Starin and Dack (3) stated that they have never found botulinus toxin in the macerated organs of animals dying of botulism, Coleman and Meyer (1) have found this toxin in the brain, liver and spleen of a guinea pig intravenously inoculated with 15 billion spores and 0.5 cc. of antitoxin. They likewise found it in the spleen of a rabbit and frequently in the blood serum of guinea pigs.



TABLE I.

*Intramuscular injections; Cl. Botulinum spores; strain 62 type A; Guinea pigs' weight, 300-350 grams; formalin injected 3-22 hours before spores.*

Number of spores	Symptoms	Death	Remarks
35 million...	Not noted	3 days	Sporulating organisms all organs
3.5 million.	Not noted	3 days	Sporulating organisms all organs
350,000....	Botulism	4 days	Sporulating organisms all organs. Blood serum + for mice. Antiserum control negative
350,000....	Not noted	4 days	Sporulating organisms wound and spleen.
3,500....	Botulism	3 days	Sporulating organisms wound and spleen. Serous fluid from wound + for mice
1,580....	Not noted	3 days	Sporulating organisms wound and spleen
790....	Not noted	3 days	Sporulating organisms wound. Serous fluid from wound + for mice. Antiserum control negative
790....	Botulism	3 days	Sporulating organisms wound
790....	Not noted	38 days	Received 85 units antiserum (sbc). Botulism doubtful. Very thin. Salivation. No spores in wound or organs
580....	Not noted	3 days	Very thin. Serous fluid + for mice
450....	Not noted	3 days	Sporulating organisms wound, liver and spleen. Macerated muscle + for mice —antiserum protected control
450....	Not noted	3 days	Sporulating organisms wound, liver and spleen. Macerated muscle + for mice —antiserum protected control
100....	Botulism	4 days	Sporulating organisms wound, liver and spleen
57....	Botulism	4 days	Sporulating organisms wound and spleen. Very thin. Serous fluid + for mice. Antiserum control negative
57....	Botulism	5 days	Sporulating organisms wound, spleen and liver. Very thin. Serous fluid + for mice
38....	Botulism	5 days	Sporulating organisms wound, spleen and liver. Very thin. Serous fluid + for mice
38....	Botulism	6 days	Sporulating organisms wound, spleen and liver. Very thin. Serous fluid + for mice. Antiserum control negative
24....	Not noted	34 days	Botulism doubtful
Controls no formalin..			Note: Salivation in all animals which died
35 million...	None	Living 6 weeks	
3,160 (sbc)..	None	Living 6 weeks	

TABLE II.

*Intramuscular injections of Cl. Botulinum spores; corn strain type A; guinea pigs weight 300-400 grams; formalin injected 4 hours and antiserum (51 units SBC), 3 hours before spores.*

No. of spores	Serum 0.3 cc.	Symptoms	Death	Remarks
3,750.....	—	Not noted	4 days	Salivation
3,750.....	—	Botulism	3 days	Died 2½ hours after symptoms appeared
3,750.....	Yes	Botulism 12 days	13 days	Wound and all organs negative. Serous fluid non-toxic for mice. Cultures negative
1,500.....	—	Botulism	3 days	Wound + + + spleen negative
1,500.....	—	Not noted	3 days	Wound + + + organs negative
1,500.....	Yes	Not noted	13 days	Wound + rare. Organs negative. Serous fluid non-toxic for mice. Cultures positive
500.....	—	Botulism	3 days	Died 3 hours after symptoms appeared
500.....	—	Botulism	4 days	Wound + + +
500.....	Yes	Botulism 17 days	17 days	Wound, organs negative. Cultures + + +.
220.....	—	Not noted	4 days	Serous fluid toxic for mice
220.....	—	Botulism	4 days	Wound + + + spleen + + +
110.....	Yes	None 1 month	—	Wound + + +

TABLE II (Continued).

No. of spores	Serum 0.3 cc.	Symptoms	Death	Remarks
110.....	—	Botulism	4 days	Wound +++
110.....	—	Not noted	3 days	Wound and spleen +++
25.....	Yes	None 1 month	—	—
25.....	—	Lost weight	Recovered	—
25.....	—	Botulism	5 days	Wound, spleen, blood +++ Phagocyto- sis. Blood serum and wound fluid toxic for mice. Antitoxin protected
15.....	—	None 1 month	—	Organs negative. Serous fluid negative for mouse
15.....	—	Not noted	Found dead 1 month	—
Controls	No formalin nor serum	None	—	Note: All animals which died had profuse salivation
500 spores per cc. in NaCl 4 days } temperature laboratory and 1 day } at 37° C. }		None	—	
Intramuscularly to guinea pig }		None	—	
Sbc to mouse. }		None	—	
500 in NaCl 1 day at 37° C. }		None	—	
Sbc to mouse }		None	—	
37,500 in NaCl 1 day at 37° C. }		None	—	

From those animals which received but few spores serous fluid or scrapings from the wound were highly diluted (1 : 10,000) and inoculated subcutaneously (with antitoxin controls) into mice. The results of this procedure showed that the wound generally contained a large amount of botulinus toxin.

In two instances the blood serum of guinea pigs which died without symptoms having been noted was tested on mice and a very potent toxin was likewise demonstrated.

#### RATS.

As rats are known to be somewhat resistant to the filtered toxin of *Cl. botulinum* I attempted to infect a series of laboratory rats with the spores of this organism. In my work with *Cl. tetani* spores experience with the injection into mice of saponin or formalin had shown me the difficulty of producing any extensive muscular lesion with non-toxic doses of these substances. Susceptibility to these chemicals differs greatly and many animals were lost. This proved to be the case with rats.

In nearly all of the animals only a transitory swelling of the injected muscle was produced by the maximum doses of debilitant which it was possible to give. This was for formalin 0.3 cc.-0.4 cc. of a 10 per cent solution and for saponin 0.1 cc. of an 0.8 per cent solution. Unfortunately those animals to which it was planned to give very large doses of spores were killed with formalin or saponin. Fourteen animals receiving a tissue debilitant but unprotected with antiserum were inoculated with from 3 million to 50 spores. One normal control showed respiratory disturbance (rapid breathing) for several days after the intramuscular injection of 27 million spores and another control was unaffected by 50,000 spores. Two guinea pig controls receiving formalin died of botulism in 3 and 4 days after the injection of 450 and 100 spores. One large rat died in 18 hours after receiving subcutaneously 1 cc. of a 6 day beef heart culture of the same strain (62). Symptoms were not noted. Two 600 gram guinea pigs received 0.4 cc. and 0.8 cc. respectively of this culture with the same result.

Of all the rats injected with formalin or saponin followed by spores only one died (in 24 days). Symptoms were not noted. This rat received 0.1 cc. of saponin, 500 spores and 0.3 cc. antiserum A. Microscopic examination of the leg muscle and organs revealed no sporulating organisms. The macerated tissue at the site of injection was inoculated into two mice one of which received antiserum. The



latter showed no symptoms; the other died during the night. The infected muscle of this rat had been eaten by other rats. Two of these were ill—one showed symptoms of botulism without respiratory disturbance. It was killed but no lesions were found in the muscle tissue which was non-toxic for mice. This tissue and the organs were free from bacilli. The other animals recovered.

Except in the one instance cited I have failed to infect rats with the doses given. Whether this is due to the presence of anti-spore substances in the tissues of the rats or to our failure to produce sufficient tissue necrosis it is impossible to state. The latter cause of this failure appears to be the more likely.

#### DISCUSSION.

Owing to the fact that the foregoing experiments were adequately controlled I feel justified in the belief that additional and overwhelming proof has been given of the ability of the spores of *Cl. botulinum* to grow and produce toxin in the animal body. While the spores used were not washed, the dilution more than a billion times of the original exhausted media would add to the body practically no nutrient material for their germination. I have no specific data as to the conditions necessary for their growth in the body. The experiments of Coleman and Meyer (closed vein and eye culture) would tend to suggest that a condition of stasis as regards the fluids in an organ, as is the case with so many other organisms, may be favorable. The same condition obtains in the foregoing experiments and in addition the presence of a medium of necrotic and coagulated tissue.

These findings are not without practical significance. Many housewives are in the habit of heating canned foods suspected of spoilage and then consuming them. As some of this food may be a veritable culture of *Cl. botulinum* the spores of which may not be killed by such heating, its consumption by a person having ulcerations or other severe lesions of the digestive tract might not be without danger. I believe, however, the records show no cases of botulism due to foods known to have been heated, though in the Montana outbreak of 1927 almost an entire family was wiped out from the consumption of soup, presumably heated, which was made from contaminated corn.

I am also unaware of any reported cases of botulism following wounds. Inasmuch as *Cl. botulinum* grows in the tissues of guinea pigs apparently under the same or similar conditions as *Cl. tetani* this may seem surprising and more especially so as regards deeply lacerated

wounds heavily contaminated with soil. I (4) have noted that soil cultures containing both *Cl. tetani* and *Cl. botulinum* when inoculated into guinea pigs may cause the death of the animals from tetanus before the symptoms of botulism appear. In further experiments when the animals were protected with anti-tetanus serum they died of botulism.

That the effect of the toxin may be cumulative is evident in our present work from the very rapid death of our animals after symptoms first appeared.

Indefinite neurologic disturbances among the war wounded are frequently referred to incipient tetanus. These symptoms may perhaps in some cases have been due to botulism and it therefore does not seem altogether improbable that sometimes botulism, very slight or fulminating, may have been overlooked.

On the other hand no direct evidence has yet been given that *Cl. botulinum* is able to grow in human tissues but it is to be noted that *Cl. sporogenes*, a closely related species is a very frequent contaminant of war wounds. While Tulloch (5) demonstrated that its presence does not markedly inhibit the production of tetanus toxin the findings of Jordan and Dack (6) as regards the toxin of *Cl. botulinum* are significant. These workers have shown that *Cl. sporogenes* when grown in symbiosis with *Cl. botulinum* may either prevent toxin production altogether by the latter, may diminish the amount that is produced, or may cause the early disappearance of the toxin. Furthermore, Dack (7) has given evidence that the filtered toxin of *Cl. botulinum* added to beef heart medium is gradually destroyed by *Cl. sporogenes* as well as by other anaerobic species with proteolytic or non-proteolytic properties. The same worker also showed that *Cl. botulinum* failed to grow in an unheated filtrate of *Cl. sporogenes*.

A consideration of all the foregoing data as well as the fact that European soils contain relatively few spores of *Cl. botulinum* may supply in a measure an explanation of the absence of reports of botulism among the war wounded.

#### CONCLUSIONS.

Evidence is given that with formalin as a tissue debilitant approximately 25 spores of *Cl. botulinum* inoculated into the muscles of guinea pigs may grow luxuriantly and produce a potent toxin.

*Cl. botulinum* sporulates readily in these tissues.

Suggestive data are given which may have a bearing upon the absence of reported botulism due to contaminated wounds.

*Bibliography.*

1. COLEMAN AND MEYER  
1922. Jour. Infect. Dis., 31, 644-646.
2. COLEMAN, GEORGE E.  
1923. *Ibid.*, 33, 384-390.
3. STARIN AND DACK.  
1925. *Ibid.*, 36, 383-412.
4. COLEMAN, GEORGE E.  
1922. *Ibid.*, 31, 556-558.
5. TULLOCH.  
1917. Jour. Roy. Army Med. Corps.
6. JORDAN AND DACK.  
1924. Jour. Infect. Dis., 35, 576-580.
7. DACK.  
1926. *Ibid.*, 38, 165-173.







Reprinted from

THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, Vol. 43, No. 6, Dec., 1928, pp. 496-506

## STUDIES ON BOTULINUS TOXIN

### 5. INFLUENCE OF NITROGENOUS AND LIPOID COMPOUNDS ON THE POTENCY OF BOTULINUS TOXIN

E. WAGNER SOMMER AND H. SOMMER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California  
San Francisco*

It has been frequently observed that animals succumb to injections of a mixture of botulinus toxin and nonspecific antitoxin in a shorter time than animals receiving the toxin alone. The same effect has been observed also when normal serum (Leuchs,<sup>1</sup> Bitter,<sup>2</sup> Coleman,<sup>3</sup> Bronfenbrenner,<sup>4</sup> Jensen<sup>5</sup> or leukocytes (Coleman<sup>3</sup>) have been inoculated simultaneously with the toxin. These observations tend to show that the addition of certain substances to botulinus toxin may increase its potency. In fact, Leuchs and Amako<sup>6</sup> demonstrated a similar adjuvant action on the poison by peptone, and Bronfenbrenner<sup>4</sup> found that its toxicity was enhanced by ordinary broth.

No quantitative tests were recorded by the workers mentioned. We undertook therefore to measure the increase in potency of botulinus toxin, type A, on the addition to it of various nitrogenous and lipid compounds. We were also interested to ascertain whether the enhancing action occurred immediately or only after incubation; temperatures of 28 and 37 C. were chosen. Dernby and Walbum<sup>7</sup> had found that the titer of diphtheria toxin was increased after its contact with an equal amount of broth for 5 hours at 37 C., so that the MLD of 0.006 cc. was reduced to 0.001 cc. Dilution of the poison in 4% peptone solution and subsequent incubation of the mixture for 6 hours decreased the lethal dose from 0.005 cc. to 0.002 cc. Determinations after 18 hours showed a loss in potency. On the basis of these and earlier experiments Dernby and Walbum had formulated the protoxin and toxinase theories, explaining the formation of diphtheria toxin. These hypotheses will be discussed in connection with the results of the experiments with botulinus toxin reported in this paper.

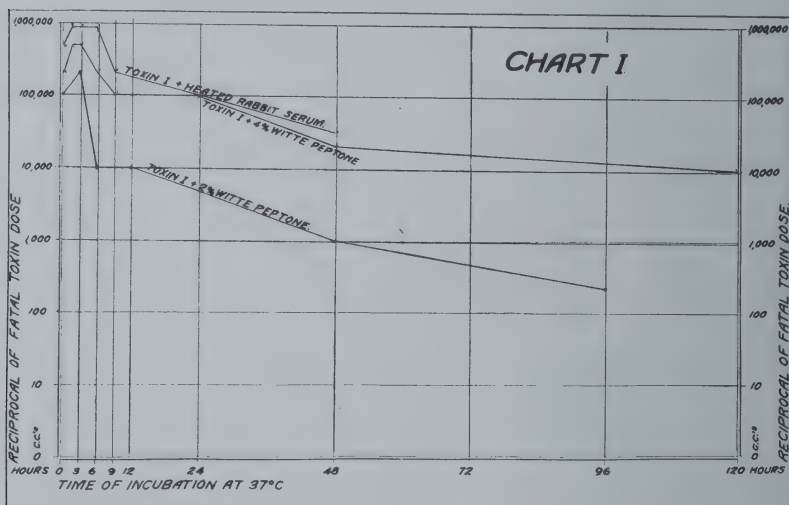
Received for publication, June 29, 1928.

1. Ztschr. f. Hyg. u. Infektionskrankh., 1910, 65, p. 55.
2. Ergebn. d. allg. Pathol. u. Path. Anat., 1921, 19, p. 781.
3. J. Infect. Dis., 1924, 34, p. 614.
4. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1924, 21, p. 318.
5. J. Infect. Dis., 1926, 39, p. 413.
6. Kolle-Wassermann: Handb. d. pathog. Mikroorg. 1912, 4, p. 943.
7. Biochem. Ztschr., 1923, 138, p. 505.

## EXPERIMENTS

*Sources of Toxin.*—Toxins 1, 2 and 3 were beefheart peptone cultures of strain 97 Cl. botulinum, type A, which had been incubated for from 14 to 15 days, filtered through paper, and stored in the icebox with phenol as a preservative. Toxin 1 was passed through an F Chamberland filter. Toxin 4 was a purified dry product prepared according to E. W. Sommer, H. Sommer, and K. F. Meyer.<sup>8</sup>

*Toxin Measurements.*—Each sample was tested by injecting intraperitoneally, into mice and guinea-pigs, from 3 to 5 different dilutions of the toxin; that dilution of the poison which in a given amount (1 cc.) killed a mouse in 48, or a guinea-pig in 96 hours was considered the MLD. Since the titers frequently had to be judged from only 2 animals, the values in the charts are to be considered approximate.



*Exper. 1.*—Equal parts of toxin 1 and a 2% solution of Witte's peptone\* were mixed and incubated at 37 C. and samples of the mixture removed at intervals, as indicated in chart 1. For tests of the toxicity of the mixture various dilutions of the samples were made in salt solution. Results: Before the incubation, 1 cc. of the toxin-peptone mixture in the dilution of 1:100,000 fatally intoxicated a mouse in 36 hours, whereas the animal receiving 1 cc. of the mixture in dilution of 1:200,000 survived. After 3 hours' incubation, the titer increased so that the dilution of 1:200,000 killed in less than 36 hours while a dilution of 1:500,000 was not lethal. In subsequent determinations

8. J. Infect. Dis., 1926, 39, p. 345.

\* If necessary the peptone and the "Aminoid" solutions were adjusted to neutrality before mixing with the toxin.

(at 6, 12 and 20 hours) the potency was found to have decreased until it was far below the original titer.

The toxin was next diluted with a 4% solution of Witte's peptone and incubated. One cc. samples of these dilutions were inoculated so that the mice uniformly received 1 cc. each of the 4% peptone solution. Results: The initial titer of the mixture was 1:200,000. After 1½ hours' incubation, it was 1:500,000 (causing death in 30 hours). After 3 hours' incubation, the titer was exactly 1:500,000.

In order to test the effect of serum on botulinus poison, dilutions of toxin 1 were made with fresh rabbit serum and incubated. Before the

TABLE 1.—THE INCREASED POTENCY OF BOTULINUS TOXIN INCUBATED WITH HORSE SERUM

Incubation at 37 C.	Toxin + Horse Serum		Toxin + Horse Serum Heated		Toxin + Salt Solution	
	Dilution Inoculated *	Result	Dilution Inoculated	Result	Dilution Inoculated	Result
0 hours	1:500,000	Symptoms	1:1,000,000	Dead in 48 hours	1:500,000	Survived
	1:100,000	Dead in 24 hours	1:500,000	Dead in 22 hours	1:100,000	Dead in 30 hours
1½ hours	1:1,000,000	Dead in 48 hours	1:1,000,000	Dead in 72 hours	.....	.....
	1:500,000	Dead in 24 hours	1:500,000	Dead in 72 hours	.....	.....
3 hours	1:1,000,000	Symptoms	1:1,000,000	Dead in 36 hours	.....	.....
	1:500,000	Dead in 36 hours	1:500,000	Dead in 36 hours	.....	.....
6 hours	1:500,000	Symptoms	1:500,000	Dead in 40 hours	1:500,000	Survived
	1:100,000	Dead in 27 hours	1:100,000	Dead in 36 hours	1:100,000	Dead in 80 hours
9 hours	1:500,000	Dead in 63 hours	1:500,000	Survived	.....	.....
	1:100,000	Dead in 22 hours	1:100,000	Dead in 63 hours	.....	.....
14 hours	1:100,000	Dead in 36 hours	1:100,000	Dead in 36 hours	1:100,000	Survived
	1:10,000	Dead in 10 hours	1:10,000	Dead in 12 hours	1:10,000	Dead in 60 hours
24 hours	1:100,000	Survived	1:100,000	Survived	1:100,000	Survived
	1:10,000	Dead in 30 hours	1:10,000	Dead in 24 hours	1:10,000	Dead in 48 hours
48 hours	1:100,000	Dead in 72 hours	1:100,000	Survived	1:1000	Survived
	1:10,000	Dead in 48 hours	1:10,000	Dead in 72 hours	1:100	Dead in 48 hours
7 days	1:1000	Survived	1:1000	Survived	1:100	Survived
	1:100	Dead in 44 hours	1:100	Dead in 72 hours	1:10	Dead in 28 hours

\* Three or four mice were injected for the determination of 1 MLD. Only the results in the 2 that gave the most significant ones are recorded in the table.

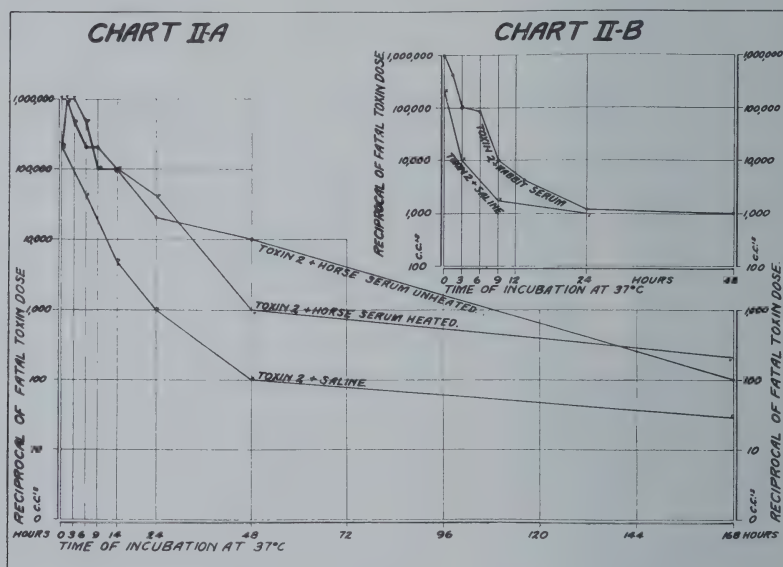
dilutions were tested they were further diluted with salt solution to such an extent that each inoculum contained only 0.1 cc. of serum. Results: At the start of the experiment 1 cc. of the serum-toxin mixture in a dilution of 1:500,000 killed a mouse in 32 hours. After 1½, 3, and 6 hours' incubation at 37 C., it killed in less than 20, 19, and 24 hours, respectively, while 1 cc. of the mixture in a dilution of 1:1,000,000 invariably produced severe symptoms for several days, after which the animals recovered. A value of 1:750,000 was chosen as an approximate MLD. (chart 1).

*Exper. 2.*—The effect of horse serum on toxin 2 was tested in the following series: 30 cc. toxin + 30 cc. horse serum; 30 cc. toxin + 30 cc. horse serum heated ½ hour at 60 C.; and 30 cc. toxin + 30 cc. salt solu-



tion. The samples were removed and after proper dilution were injected at the intervals indicated in table 1 and chart 2. Results: The original saline-toxin titer,  $>200,000$  mouse MLD per cc., was immediately increased by the addition of the serum. In subsequent tests the titer of the toxin held in heated and unheated serum was higher (at 3, 6, and 9 hours) and equal to that of the original salt dilution (at 14 hours).

A similar experiment made with normal rabbit serum and toxin 2 also showed a definite increase of potency in this mixture over that of the saline control (chart 2B).

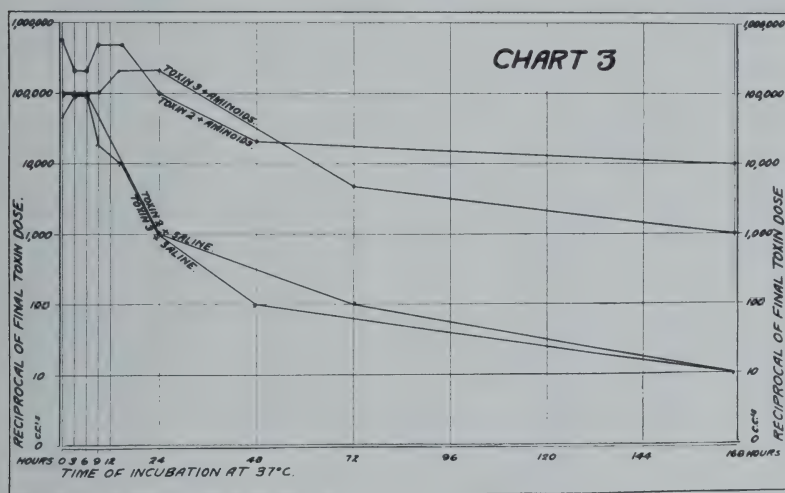


*Exper. 3.*—Toxin 2 and toxin 3 were incubated each with an equal amount of a 25% solution of aminoids (a commercial protein hydrolysate, biuret free). The control contained a corresponding amount of salt solution. The data of these experiments are shown in chart 3.

Results: There was an increase in potency of toxin 2 in aminoids over that of the salt control. The drop in titer on the 3rd and 6th hour of incubation may be more apparent than real, since the mice receiving the dilutions of 1:500,000 had marked symptoms in both cases and those inoculated with a dilution of 1:100,000 died in less than 48 hours. On the 9th and 15th hour the toxin dilution of 1:500,000 killed in 40 and 36 hours, respectively. The chart also shows that one of the salt solution controls acquired a slight rise in toxin titer. This behavior

of the control is the only example of its kind which has been encountered in the numerous tests with an unfiltered toxin. It may, in all probability, be explained by the variable susceptibility of the test animals.

There was no apparent increase in the potency of toxin 3 plus aminoids prior to incubation; however, an indication of a slight rise in titer was observed on the 14th and 24th hour; mice receiving 1 cc. of a dilution of 1:100,000 at these time intervals died in 20 and 26 hours, respectively, whereas those inoculated in the first four determinations died in 48 hours.



The deterioration was remarkably decreased by the presence of aminoids. After 7 days' incubation the toxin-aminoid mixtures had titers of 1:10,000 and 1:1000, while the potency of the saline controls had dropped to 1:10.

*Exper. 4.*—In order to eliminate as far as possible the nonspecific substances of the culture fluid, a purified dried toxin was used in the next series. Twenty mg. of toxin 4 were dissolved in 10 cc. of salt solution and dilutions of 1:10 and 1:100 were made in normal horse serum, 4% Witte's peptone solution, and salt solution. Incubation took place at 28 C. The tests were made on guinea-pigs. Results: The addition of serum and peptone caused an immediate increase in potency of the purified toxin. Prolonged incubation for 96 hours intensified the toxicity of the serum-toxin mixture, while the peptone retarded the rate of deterioration.

*Exper. 5.*—Experiments were made to ascertain the effect of incubating a purified toxin with lecithin (acid and neutral), sodium oleate, sodium stearate, and sodium ricinoleate, with acid and basic phosphates and salt solution as controls.

0.1 gm. of lecithin (Digest Ferment Company) was dissolved in from 1 to 2 cc. of hot alcohol and stirred into 100 cc. of salt solution. This emulsion had a  $P_H$  of 4.0 to 4.5; part of it was adjusted to neutrality with sodium phosphate. 1% solutions of the sodium salts of oleic and stearic acid were prepared and as much of the excess base was neutralized with HCl as was possible without causing a precipitate of the free fatty acids. The  $P_H$  values were then 9.0 and 7.8 for the stearate and the oleate, respectively. Sodium ricinoleate in a 1% solution gave a  $P_H$  of 7.4.

TABLE 2.—THE INCREASED POTENCY OF BOTULINUS TOXIN (PURIFIED DRIED FORM) WHEN INCUBATED WITH PEPTONE AND WHEN INCUBATED WITH HORSE SERUM

Incubation at 28 C. Inoculated *	Toxin + Peptone		Toxin + Serum		Toxin + Salt Solution	
	Dilution	Result	Dilution Inoculated	Result	Dilution Inoculated	Result
0 hours	1:750	Dead 60 hours	1:750	Dead 72 hours	1:500	Dead 72 hours
	1:500	Dead 50 hours	1:500	Dead 26 hours	1:200	Dead 40 hours
12 hours	1:1,000	Dead 8½ days	1:1,000	Dead 60 hours	1:500	Survived
	1:750	Survived	1:750	Dead 72 hours	1:200	Dead 84 hours
	1:500	Dead	1:500	Dead 42 hours	.....	.....
24 hours	1:750	Dead 96 hours	1:750 †	Dead 48 hours	1:500	Survived
	1:500	Dead 86 hours	1:500	Dead 48 hours	1:200	Dead 36 hours
48 hours	1:500	Survived	1:750 †	Dead 36 hours	1:200	Dead 48 hours
	1:200	Dead 36 hours	1:500	Dead 36 hours	1:100	Dead 36 hours
96 hours	1:500	Survived	1:1,000	Dead 96 hours	1:200	Survived
	1:200	Dead 96 hours	1:750	Dead 90 hours	.....	.....
10 days	1:200	Survived	1:750	Dead 5 days	1:100	Survived
	1:100	Dead 5 days	1:500	Dead 96 hours	1:50	Dead 24 hours

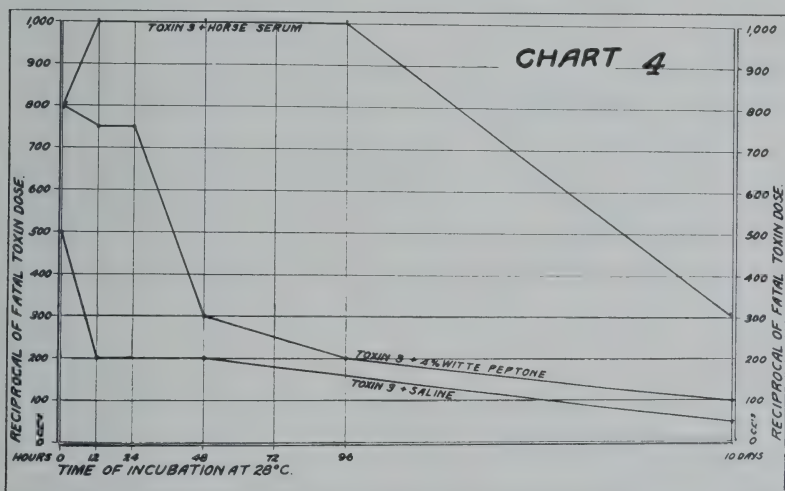
\* Three or four mice were injected for the determination of 1 MLD.

† Not tested in higher dilution.

Results: Chart 5 records the results. Only lecithin in acid and neutral solutions had a slight enhancing effect on the toxin. On the other hand, it may be seen in chart 5 that the  $P_H$  value is of primary importance for the deterioration of botulinus toxin. In an acid medium ( $P_H$  4.3) the titer of the toxin stays fairly constant for several days at 37 C., while a  $P_H$  of 8.0 destroys most of the potency in 24 hours. The action of the stearate and oleate may be explained on the same assumption. The detoxifying action of sodium ricinoleate on the poison is not immediate but is distinctly more rapid than would be predicted from the slight alkaline reaction. These observations confirm the statement of Larson and Nelson.<sup>9</sup>

## DISCUSSION

In summarizing the results of the experiments presented, it may be stated that when the botulinus toxin was mixed with serums its potency was increased 2-10 times over the initial titer. When the toxin was mixed with Witte's peptone instead of with rabbit or horse serum, its toxicity was approximately doubled (3 experiments), while, when it was combined with aminoids, its potency showed at 2 and 6 fold increase. Lecithin raised the potency 1.5 times in 2 experiments. No adjuvant action was observed with soaps. In this connection, it must be stated that 1 of the 8 saline and phosphate controls doubled its potency during the first 3 hours of incubation.



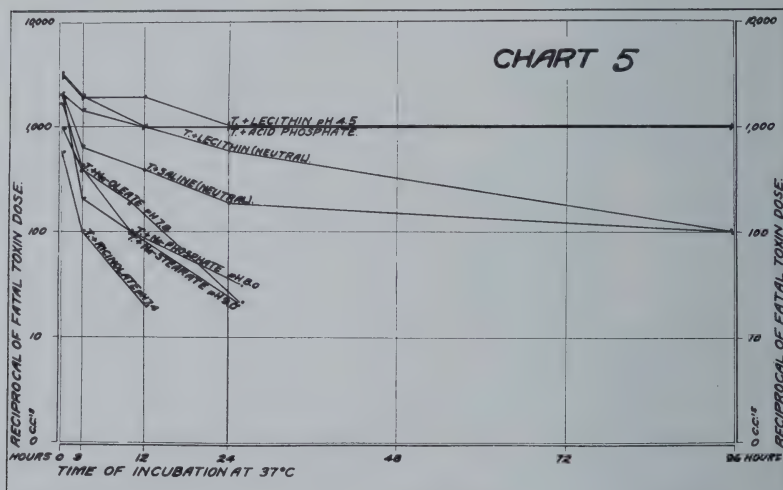
Before the adjuvant effect of the nitrogenous and lipid compounds is discussed, it is advisable to consider the rate of destruction which takes place in a solution of botulinus toxin on incubation at 28 and 37 C. After 24 hours at 37 C., 5 toxins diluted in salt solution (charts 2, 3 and 5) contained only from 1 to 10% of the original MLD value; the sample incubated at 28 C. (chart 4) decreased to 40%. The stability of the toxin at different  $P_H$  values is well illustrated in chart 5. At a  $P_H$  of 4.3 the decrease was approximately 50%, and at  $P_H$  8.0 it was approximately 98%. These and other observations tend to show that the maximal stability of the poison lies between  $P_H$  4.0 and 5.0. The determination of an exact toxin destruction curve would naturally necessitate the sacrifice of a large number of animals and was not undertaken.



These results compared with the data recently published by Walbum<sup>10</sup> for the toxin of diphtheria indicate that botulinus toxin incubated at 37 C. is much more labile than the poison of the diphtheric bacillus. It is well known that the latter at neutrality deteriorates slowly, a condition certainly not found for the botulinus toxin.

By comparison of the curves representing the mixtures of the toxin with serum, peptone, aminoids, and lecithin with that of the toxin diluted in saline solution, three distinct effects may be noted:

1. Serum and lecithin as well as peptone immediately enhance the toxin titer. The increase in potency on the addition of serum and pep-



tone seems to substantiate the original protoxin theory of Walbum, as applied to the diphtheria toxin and the hemolysins. Walbum assumes that the bacterial cells excrete an atoxic product (protoxin) which is immediately activated by some nitrogenous substance (albumose) of the medium.

This conception does not explain the effect of the lecithin. The increase of the potency caused by this substance may be due merely to the solvent action of the lipoid. Many years ago De Waele<sup>11</sup> found that small concentrations of lecithin enhanced diphtheria toxin when injected subcutaneously, and he attributed this effect to the increased permeability of the cells for the poison. On intraperitoneal injection of

10. Kolle, Kraus, and Uhlenhuth: Handb. d. pathog. Mikroorg., ed. 3, 1928, 2, p. 535.

11. Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap., O., 1909, 3, p. 478.

the toxin-lecithin mixture, however, he noted a retarding action of the lecithin, which obviously is at variance with the results obtained with botulinus toxin.

As a possible explanation of the adjuvant effect, the direct action of the foreign protein on the animal body could be considered. Such a mechanism is, however, unlikely since identical results were obtained with widely variant and relatively small amounts of serum and peptone, which had been inoculated along with the toxin.

2. Aside from an immediate increase in toxin titer, serum and peptone in several series had a second distinctly different effect on the potency of the poison. After an incubation period of several hours the toxicity was found higher than at the beginning of the experiment (charts 1, 2, 4). This rise in potency could not be produced consistently, but in 2 out of 5 experiments with serum the titer, on incubation of the mixture for  $1\frac{1}{2}$  hours, increased to 1.2 and 5 times the original value. With peptone, the titer of the toxin rose to 2 and 2.5 times the original titer, after  $1\frac{1}{2}$  and 3 hours' contact.

In experiments with the diphtheric toxin, Dernby and Walbum obtained similar results; broth after 9 and 5 hours' contact at 37 C., increased the titer of the toxin to 2 and 5 times what the titer had been at first; while Witte's peptone enhanced the potency approximately 2 fold after 6 hours. Both workers state that the effect was by no means constant.

This apparent formation of toxin on incubation of a toxin with protein derivatives was first explained on a theoretical basis by Dernby. He assumes that, on autolysis of the bacteria, specific proteolytic enzymes (toxinas) are set free, which act on the albumose of the medium to form the toxin. Since he assumes that the destruction of the poison is enzymatic in nature, the formation of toxin is dependent on 2 processes working in opposite directions. The experiments reported in this paper furnish evidence that the "toxinase" theory might possibly apply to the toxin of *Cl. botulinum*. Considering the greater proteolytic activity of the anaerobe, one is not surprised to find the maximal toxicity developed after a shorter period of incubation in the botulinum than in the diphtheric solution. In view of the fact, however, that a rise in the titer of botulinus toxin occurred on the addition of a 25% aminoid solution (2 experiments are detailed in chart 3), the toxinase theory cannot find universal application. More detailed experiments are necessary to elucidate this point. The ultimate verification of

the toxinase theory for botulinus toxin or any other toxin can only be accomplished when the poison is once separated from the proteolytic enzymes. Thus far the samples used in the tests reported in this paper, inclusive of the dry toxin, contained gelatinase and peptidase.

There is a remote possibility that a uniform explanation may hold for the increase in toxin before and after incubation. Since the potency was not measured at shorter intervals than  $1\frac{1}{2}$  to 3 hours the experiments are not sufficiently complete to allow final conclusions.

The composition of the toxic fluid may be of primary importance for the attainment of a high adjuvant effect. The toxins used for the experiments had a high titer and had been produced in protein-rich mediums containing peptones. It is not unlikely that the latter had already had an additive effect and that consequently the toxin could not be activated much more. The same holds true for the dried toxin, since it had been produced from a similar base. On the other hand, the increase in potency may well be due to a reactivation of an aged toxin. The samples which served in these experiments were fresh and had been stored for a short period. It is barely possible that a weak toxin, aged for a considerable period of time, may be more readily subjected to a greater activation.

3. A third effect which the protein derivatives exert on the botulinus toxin is the retardation of its spontaneous destruction. This protection is pronounced when the poison is diluted in 25% aminoid solution (chart 3). It is doubtful whether the serum or the peptone, in the dilutions used, had a similar protective effect. If it is assumed that the toxin is altered by an enzyme—possibly peptidase—the retarded destruction can readily be explained by the fact that a high concentration of protein split products (amino acids) inactivates the peptolytic ferments. The protection of the toxin in an acid environment is probably due to the same factor, since the enzymes of *Cl. botulinum* thus far investigated (gelatinase, peptidase, and lipase) are practically inactive at  $P_H$  4.0.

#### SUMMARY

On incubation of neutral botulinus toxin in salt solution at 37 C. a decrease in potency of 90 to 99% occurred in 24 hours. The deterioration was accelerated in alkaline mediums, but was greatly retarded at  $P_H$  4.3. The addition of serum caused an immediate increase in toxicity; in several samples a further rise in the titer of the toxin was observed on incubation. Witte's peptone showed the same influence as serum but

in a less marked degree. Dilution in a 25% aminoid solution greatly stabilized the toxin. The addition of lecithin slightly increased the initial titer of the toxin. No effect was observed with sodium stearate and oleate. Sodium ricinoleate caused rapid though not immediate inactivation of the poison.

The results are discussed in the light of the protoxin and toxinase theories.





## STUDIES ON THE ANTIGENIC SUBSTANCES OF CL. BOTULINUM XXXIII

### I. COMPLEMENT FIXING SUBSTANCES IN ALCOHOLIC EXTRACTS

JEANNE LOMMEL<sup>1</sup> AND JANET B. GUNNISON

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of  
California, San Francisco*

Received for publication October 1, 1928

Although many studies on the antigenic complex of the bacterial cell have been made, the nature of the specific substances of an anaerobic organism has, as far as we know, not been investigated. *Cl. botulinum* was chosen since the species is divided into serologic groups as well as into toxicologic types. This work is an attempt to determine the nature of the substances responsible for the specificity. A modification of the alcoholic extraction method employed by Landsteiner and Levine (1) in their recent study on cholera vibrio was used for preparation of the antigenic reagents.

#### EXPERIMENTAL PROCEDURE

The extracts were made as follows: The organisms grown for eighteen hours at 37°C. were centrifuged from 20 liters of casein digest broth, washed twice in ice cold saline to prevent autolysis; then placed in 500 cc. of 75 per cent alcohol and allowed to stand at room temperature for three days. The bacterial mass which was never autolyzed was then boiled in the same alcohol under a reflux condenser for one hour and filtered through paper while hot. A second extraction was made by boiling the bacteria again in the same amount of fresh 75 per cent alcohol. The first and the second extracts were kept separately. The hot filtrates were absolutely clear but became turbid on cooling. After standing over night in the ice box, the resulting precipitates were

<sup>1</sup> Exchange Fellow, Commission for Relief of Belgium Foundation.

removed by centrifugation, washed with absolute alcohol and then with ether, dried and carefully weighed.

In this way a greyish powder was obtained which was placed in slightly alkaline saline (pH 7.8 to 8.0) in the dilution of 1:150. The average yield was 100 to 300 mgm. from the first boiling and much smaller quantities from the second.

The extracted substance was insoluble in distilled water, saline, acetone and ether; and faintly soluble in dilute and concentrated alkali and acid. There was not sufficient of these preparations to study their chemical composition except by simple qualitative tests. There was little or no protein present. With one exception, the preparations gave a very faint biuret reaction. One gave a negative test. They formed a precipitate in the Millon test but failed to color it on heating. The xanthoproteic and Adamkiewicz tests were negative. The extracted substances were not precipitated by tannic, picric or nitric acid. The Molisch tests were strongly positive, indicating the presence of a carbohydrate.

An extract prepared from a three-week old culture in which considerable autolysis had taken place possessed the same properties, so far as could be determined, as the substance obtained from the eighteen-hour cultures, except that the biuret test was negative.

#### COMPLEMENT FIXATION TESTS

The behavior of these substances in the complement fixation test was studied. Very fine suspensions of the extracted substances were made in slightly alkaline salt solution by shaking with beads. The antisera were prepared by intravenous inoculations of rabbits with saline suspensions of young bacteria (2). Two series of tests were made using different methods. In the first series (table 1) the third method of Kolmer (3) was employed except that the primary incubation was made at 37°C. for one hour instead of at 6°C. for eighteen hours. In the second series (table 1) the technic described by Gunnison and Schoenholz (2) for *Cl. botulinum* was followed. Smaller quantities of the reagents of the hemolytic system are used in this method, and

2½ units of antigen are required instead of 10 units as in the Kolmer test.

The two methods gave identical results except for occasional slight differences in the end points. The extracts were found to be highly suitable as antigens in the complement fixation reaction. The ratio of the antigenic to the anticomplementary dose was very high, and as little as 0.03 to 0.01 mgm. gave complete fixation.

The results indicated that the extracts were species specific, since they gave no reactions with normal serum, nor with serum prepared with *Br. abortus*. Two of the extracts showed type

TABLE 1  
*Results of complement fixation reactions using third method of Kolmer*

EXTRACT*			ANTISERUM DILUTION SHOWING COMPLETE FIXATION				
Number	Serologic group	Type	Group I, type A	Group II, type A	Group IV, type B	Group V, type B	Group VI, type B
1 (a)	I	A	1:200	1:40	1:400	1:400	1:40
2 (a)	I	A	1:400	1:200	1:20	1:1,000	1:40
3 (a)	II	A	1:400	1:400	1:40	1:40	1:40
4 (a)	V	B	1:400	1:40	1:400	1:1,000	1:40
4 (b)	V	B	1:200	1:20	1:400	1:400	1:20
5 (a)†	V	B	1:40	1:20	1:1,000	1:1,000	1:10
5 (b)	V	B	1:40	1:10	1:200	1:200	

(a) = First boiling.

(b) = Second boiling.

\* Dose of antigen = 10 antigenic units.

† Extract No. 5 was prepared from a three-week culture.

specificity, but none of them were specific for the serologic groups.

The two extracts made from group I type A organisms reacted to a higher titer with the antiserum of group V type B than with the homologous antiserum. The extract from the group II type A culture showed marked type specificity, but reacted with group I antiserum.

The preparation from a young culture of group V type B organisms gave marked fixation with group I antiserum. On the other hand, the substance extracted from a three-week culture of this group was type specific. However, it will be noted that the



two preparations from young cultures of group I did not give the same reactions. It is probably impossible to obtain extracts having identical properties by the methods employed. Hence, no definite conclusions can be made as to the significance of the difference in behavior of the various preparations.

In three instances both the first and second extractions from a given bacterial mass were tested, and the second was found to be less anticomplementary than the first.

An interesting observation was that the antiserums reacted to much higher titer with the homologous suspensions of whole

TABLE 2

*Comparison of results obtained, using alcoholic extracts and saline suspensions as antigens in the complement fixation test\**

ANTIGEN			ANTISERUM DILUTION SHOWING COMPLETE FIXATION				
Nature of	Sero- logic group	Type	Group I, type A	Group II, type A	Group IV,† type B	Group V, type B	Group VI,† type B
Alcoholic extract.....	I	A	1:400	1:400	1:40	1:400	1:40
Saline suspension.....	I	A	1:20,000	1:200	1:100	1:1,000	<1:100
Alcoholic extract.....	II	A	1:400	1:400	1:40	1:100	1:40
Saline suspension.....	II	A	1:400	1:5,000	<1:100	1:100	<1:100
Alcoholic extract.....	V	B	1:200	1:40	1:400	1:200	1:40
Saline suspension.....	V	B	1:400	<1:100	1:200	1:10,000	1:100

\* Technic described by Gunnison and Schoenholz (2) used.

† Titer with the homologous saline suspension = 1:20,000.

‡ Titer with the homologous saline suspension = 1:5,000.

organisms than with the homologous extracts (table 2). The titers obtained with the extracted substance as antigens closely paralleled the titers of the cross reactions with whole organisms. Groups I and V, for example, gave marked cross reactions in lower dilutions when whole organisms were used, and the extracts from these groups reacted to about the same extent with the antiserum of either group.

Since it was thought that the extracts might be slightly soluble in saline, they were centrifuged and the supernatant fluid used in precipitin tests. As the results were entirely negative, it may be assumed that none of the extract went into solution. This con-

clusion is justified as Molisch tests of the supernatant fluid were invariably negative.

#### DISCUSSION

The work of numerous authors on the specific substances of various aerobic organisms has recently been reviewed by Heidelberg (4). It has been clearly demonstrated that in the case of certain organisms such as pneumococcus, Friedlander's bacillus, and *Streptococcus viridans*, the specificity is determined by type specific carbohydrate substances. Recently Landsteiner and Levine (1) and Furth and Landsteiner (5) working with alcoholic extracts of vibrio cholera and of bacilli of the typhoid group have again shown that specific carbohydrates can be isolated from these bacteria. Although type specificity among many widely different group of organisms depends upon a carbohydrate substance, this is not universally the case. Lancefield (6) has demonstrated that a protein substance is responsible for the type specificity of *Streptococcus hemolyticus* and that the carbohydrate is merely species specific. This is particularly interesting since she had previously shown (7) that, in the closely related *Streptococcus viridans* group, the carbohydrate was the specific factor.

Hence, it is not at all surprising to find that the substance described here, which contained carbohydrate but little or no protein, does not determine the group specificity. The substance isolated from *Cl. botulinum* differs from those described for other organisms in that it is insoluble or only slightly soluble in ordinary solvents. This insolubility may possibly be due to the effect of boiling in alcohol.

It is remarkable that soluble protein substances were not obtained with extraction with 75 per cent alcohol. Landsteiner and Levine (1) and Furth and Landsteiner (5) obtained a large protein yield by this method. Other authors have also secured protein substances by various methods of alcoholic extraction. However, it must be recalled that *Cl. botulinum* differs greatly from any of the bacteria previously studied.

The behavior of the extracts in the complement fixation tests indicated that they contained the antigenic factor responsible for

the cross reactions noted among the serologic groups when intact organisms were used as antigens. The group specific factor was entirely absent. The fact that the extracts of groups I and V reacted almost equally well with the antisera of either group is not surprising, if one recalls that these groups showed marked cross reactions in various serologic tests with whole organisms. The extract of group II, on the other hand, failed to react with type B antisera; and whole organisms of this group showed the same specificity.

The extracts seemed to be species specific, but they must be tested with the antisera of closely related organisms, especially *Cl. sporogenes*, before this can be definitely stated. The observation that the extract obtained from a three-week culture was more specific than those from eighteen-hour cultures is important. Since the second extraction from a given mass of bacteria was less anticomplementary than the first, it may be assumed that there was also a chemical difference. These points deserve further study.

The results are of interest since, for the first time, a study of the antigenic complex of a proteolytic, flagellated anaerobic organism has been undertaken. The substance described should be collected in sufficiently large quantities to study its chemical nature. While it is improbable that it will stimulate the formation of antibodies, this point must yet be determined. Attempts should be made to isolate other fractions of *Cl. botulinum* including the protein constituents in order to ascertain which of these is responsible for type and group specificity.

#### CONCLUSIONS

1. Substances have been obtained from *Cl. botulinum* by extraction with 75 per cent alcohol, which contained little or no protein. They gave a positive Molisch reaction, indicating that carbohydrate was present.
2. These substances gave strong complement fixation reactions with antibacterial immune sera. They were insoluble in salt solution and therefore failed to react in the precipitin test.
3. They seemed to possess species specificity.

4. The extracts had neither specificity for the serologic group nor for the toxicologic type. They apparently contained the non-specific factor responsible for the cross reactions observed among the serologic groups when intact organisms were used as antigens.

## REFERENCES

- (1) LANDSTEINER AND LEVINE: Jour. Exper. Med., 1927, **46**, 213.
- (2) GUNNISON AND SCHOENHOLZ: Jour. Immunol., 1927, **13**, 79.
- (3) KOLMER: Infection, Immunity and Specific Therapy, Third Edition, Philadelphia, W. B. Saunders and Co., 1925, p. 478.
- (4) HEIDELBERGER: Physiol. Rev., 1927, **7**, 107.
- (5) FURTH AND LANDSTEINER: Jour. Exper. Med., 1928, **47**, 171.
- (6) LANCEFIELD: Jour. Exper. Med., 1928, **47**, 91, 469, 481.
- (7) LANCEFIELD: Jour. Exper. Med., 1925, **42**, 377.





THE OCCURRENCE OF NONTOKIC STRAINS OF  
CL. PARABOTULINUM. XXXIV

J. B. GUNNISON AND K. F. MEYER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco, California*

It has been noted repeatedly that under artificial cultivation strains of *Cl. paratobotulinum*<sup>1</sup> may lose their power to produce toxin. Van Ermengem<sup>2</sup> found that Von Hibler's<sup>3</sup> strain had become nontoxic. Shippen,<sup>4</sup> Dickson,<sup>5</sup> Orr,<sup>6</sup> Burke, Elder and Pischel<sup>7</sup> and Zeissler and Rassfeld<sup>8</sup> have observed atoxic cultures of this organism. Bengtson<sup>9</sup> showed that *Cl. botulinum* type C gave rise to nontoxic variants, and Theiler<sup>10</sup> reported that the organisms involved in bovine botulism in South Africa also displayed this tendency. It is not unlikely that the so-called *Cl. sporogenes* isolated by McIntosh and Fildes<sup>11</sup> and by Reddish<sup>12</sup> from cultures of *Cl. paratobotulinum* may in reality have been nontoxic forms of the latter organism. Reddish<sup>12</sup> stated that the majority of the American strains were contaminated with *Cl. sporogenes*. Hadley<sup>13</sup> subsequently advanced the theory that these nontoxic organisms were not contaminants but variants of *Cl. paratobotulinum* which had arisen as a result of dissociation. Bronfenbrenner, Schlesinger and Calazans<sup>14</sup> claimed that they could type cultures which had lost their toxicity by means of the agglutination test. Schoenholz and Meyer<sup>15</sup> worked with several type B strains which, after having lost their toxin producing ability, still gave their original specific agglutination reactions.

Received for publication, April 23, 1929.

1. In this and subsequent publications from this laboratory the classification as proposed by Bengtson: Hyg. Lab. Bull. 136, p. 30, has been adopted. For further details consult paper 38 of this series, p. 119, this issue.

2. Kolle und Wassermann Handbuch, 1912, 4, p. 909.

3. Untersuchungen über die Anaeroben, 1908.

4. Arch. Int. Med., 1919, 23, p. 346.

5. Rockefeller Institute for Medical Research, Monograph 8, 1918.

6. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1919, 17, p. 47.

7. Arch. Int. Med., 1921, 27, p. 265.

8. Zentralbl. f. Bakteriologie, 1928, 110, p. 24.

9. Pub. Health Rep., 1922, 37, p. 2252.

10. 11th and 12th Report of Director of Veterinary Education and Research, Union of South Africa, 1927.

11. Med. Res. Com., Special Report Series 12, 1917.

12. J. Infect. Dis., 1921, 29, p. 120.

13. J. Infect. Dis., 1927, 40, p. 94.

14. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1921, 19, p. 21.

15. J. Immunol., 1925, 10, p. 1.

As far as we know, there have been no reports of the isolation of nontoxic strains of *Cl. parbotulinum* type A or B directly from contaminated material. Undoubtedly, because of the close resemblance between *Cl. parbotulinum* and *Cl. sporogenes*, any nontoxic organisms found have been given the latter classification. It has been the custom in this laboratory for the past two years to make agglutination tests with all cultures morphologically resembling *Cl. parbotulinum* whether toxic or not.

*Methods.*—Each sample was first tested directly for toxicity by feeding guinea-pigs and injection of mice. Cultures were then made as follows: about 2 teaspoonfuls of the specimen were planted in a flask containing 200 to 500 cc. of beef heart peptic digest broth stratified with vaseline, which had been heated for half an hour in the Arnold sterilizer and allowed to cool to 40 to 60 C.; a second flask of this medium was inoculated with an equal amount of material previously heated at 80 C. for half an hour; and shake cultures in deep liver agar were made directly from the material without enrichment in beef heart medium. After 3 to 7 days incubation, shake cultures were made from the flasks and colonies were fished into tubes of beef heart medium.

The resulting cultures were tested for toxicity by injecting mice subcutaneously with 1 cc. of the supernatant fluid. The cultures were repurified by repeated isolation from liver agar shake tubes. Antigens were prepared and agglutination and absorption tests were made with specific group antisera as described by Schoenholz and Meyer.<sup>15</sup> Finally cultural and biochemical tests were carried out, following the methods described in paper 38<sup>1</sup> of this series.

In this way nontoxic strains, serologically proven to be *Cl. parbotulinum*, have been isolated directly from three contaminated samples of food; namely, home canned corn, home canned Bartlett pears, and pickled spiced sardines. These cultures formed lenticular colonies with polar fluffs, such as are characteristic of many strains of *Cl. parbotulinum*, but are never seen with the strains of *Cl. sporogenes* which have been studied in this laboratory. The cultures were agglutinated in high dilutions by antisera prepared from a group 5 type B strain (according to the classification of Schoenholz and Meyer,<sup>15</sup>) and to a slight extent by antisera of group 1 type A. Absorption tests showed that the three strains belonged to group 5 type B. There was no agglutination with a *Cl. sporogenes* antiserum.

The cultures possessed the cultural and biochemical characteristics of the American strains of *Cl. parbotulinum* types A and B. The carbohydrate reactions were of especial interest. In a medium containing 0.5% Difco peptone, 0.3% Liebig's extract, and 1% carbohydrate, these strains fermented glucose, levulose, maltose, glycerol, salicin, and dextrin. These sugars are fermented by the majority of the American type A and B strains, while the type cultures of *Cl. sporogenes* ferment

only glucose, levulose, maltose, and glycerol. Thus morphologically, culturally, and serologically, these nontoxic cultures must be identified as Cl. parobotulinum.

The sardine specimen, which had not been canned but was stored in bulk in barrels, was obtained from Monterey, California. The sample was nontoxic and only nontoxic cultures could be obtained from it. From both the corn and pear samples, toxic as well as nontoxic cultures were isolated as described below.

The corn specimen had been involved in a botulism outbreak in Wahkiacus, Washington; but was nontoxic for mice and guinea-pigs, when received at this laboratory. Several grams of the corn were inoculated into a flask of very hot (probably 80 to 90 C.) beef heart

TABLE 1.—THE OCCURRENCE OF TOXIC AND NONTOXIC ORGANISMS IN MASS CULTURES OF CL. PARABOTULINUM

Number of Flask	Treatment of Corn Before Inoculation	Approximate** Temperature of Medium when Inoculated	Toxicity After Incubation	Total Number of Colonies Tested	Number of Toxic Colonies Isolated		Number of Nontoxic Colonies Isolated
					Sero-logic Group 2	Sero-logic Group 5	Sero-logic Group 5
1	None	Very hot	+	13	6	3	4
2	None	Very hot	+	96	6	8	82
3	None	Warm	—	11	0	0	11
4	Heated 60 C. for 30 minutes	Warm	+	16	0	15	1
5	Heated 80 C. for 30 minutes	Very hot	—	12	0	0	12
6*	Heated 60 C. for 30 minutes	Warm	+	52	2	20	30

\* Flask 6 was not planted directly with corn, but was a subculture of flask 3.

\*\* The exact temperature was not known. The "very hot" flasks were inoculated soon after removal from the Arnold sterilizer, when their temperature was probably between 80 and 90 C. The "warm" flasks were allowed to cool to 30 or 40 C. before planting.

medium, and type A toxin was demonstrated after 6 days incubation at 37 C. Shake cultures were made directly from the corn without heating and 15 characteristic lenticular colonies were fished, all of which proved to be nontoxic (group 5). However, when colonies were isolated from the mass culture in beef heart, both toxic and nontoxic forms were found (table 1).

The toxic cultures all produced type A toxin, but serologically they fell into two groups; namely group 2 type A and group 5 type B. Hence some of the cultures were identical with the nontoxic forms. This was the first time that organisms producing type A toxin but giving the agglutination reactions of a type B strain had been encountered, although the converse condition had been noted in two instances.

The remainder of the corn sample was inoculated, both with and without previous heating, into flasks of beef heart at various tempera-



tures (table 1). These flasks were tested for toxicity and shake cultures were made from day to day. Colonies were isolated from the agar tubes and their toxicologic and serologic properties determined. The flask of beef heart which was treated in the same manner as the original culture; i. e., inoculated with unheated corn while the medium was very hot, became toxic as did the culture planted with corn previously heated to 60 C. for 30 minutes. All of these mass cultures, both toxic and nontoxic, contained *B. subtilis*, which was present as a contaminant in the specimen of corn when received.

These results seemed to indicate that the heating of the corn or the temperature of the medium at the time of inoculation had some effect upon the production of toxin. Since no more of the corn sample was available, mass subcultures were made from the nontoxic flask 3 (table 1) by transplanting 10 to 15 cc. to fresh beef heart medium. As Geiger and Benson<sup>16</sup> had shown that the addition of corn or beans to beef heart cultures of soil, containing spores of both type A and type B *Cl. paratubulinum*, seemed to favor the development of type A toxin, about 5 grams of sterile canned corn were added to one series of flasks. Again potent toxin was formed in the flasks inoculated with the culture heated at 60 C. and in the one planted with unheated culture while the medium was hot. The addition of corn seemed to have no effect. This experiment was repeated several times with similar results.

That the toxic organisms were not destroyed by heating under the conditions of these tests was shown by inoculating a series of cultures with 10 cc. of material from the toxic flask 1, after heating at 60, 80 and 100 C., respectively, for 30 minutes. All of these mass cultures produced a potent poison.

From those flasks in which no toxin could be demonstrated, only nontoxic group 5 cultures could be isolated, while from those in which toxin was present, toxic group 5 and occasional group 2 cultures were separated. Toxic cultures were obtained in small numbers at irregular intervals and the fishing of such colonies seemed to be purely a matter of chance. There was no cross agglutination of group 5 cultures with group 2 antiserum or vice versa.

The sample of canned pears had been responsible for two fatal cases of botulism in Los Banos, California (paper 39<sup>17</sup> of this series), and the original material was highly toxic. All the colonies fished from direct shake cultures were nontoxic. The flask of beef heart

16. Pub. Health Rep., 1923, 38, p. 1611.

17. J. Infect. Dis., 1929, 45, p. 135.

planted with unheated pear pulp became toxic, but colonies isolated from it failed to form toxin. The flask inoculated with pear pulp heated at 80 C. remained nontoxic. However, from a third flask planted with pears heated at 60 to 70 C. for half an hour, only toxic cultures could be isolated. Here again there was the same peculiar relation to temperature; heating at 60 C. seemed to favor the growth of toxicogenic organisms, while higher or lower temperatures inhibited it. Krumwiede has, according to verbal communications to one of the authors, made a similar observation in connection with the study of olives which were involved in an outbreak in New York.<sup>18</sup>

The toxic cultures were serologically identical with the nontoxic; i. e., they were agglutinated by the serum of group 5. This was the second strain isolated which produced type A toxin but reacted with type B agglutinating serum. Since the two forms were serologically identical it is quite possible that they were variants.

All attempts to induce the isolated, presumably pure, nontoxic cultures to produce toxin were unsuccessful. The organisms were grown in beef heart broth containing corn, in milk, in Van Ermengem's glucose veal broth, and in the presence of toxin; but no toxic cultures were obtained. The effect of temperature was tested by heating 10-day old beef heart cultures at 60 C. for 30 minutes and then transferring to fresh tubes and flasks of medium, but again there was no production of poison. Under the conditions of these experiments, heating at 60 C. had no effect on the pure cultures of nontoxic organisms.

#### DISCUSSION

It has been shown in this study that toxic and nontoxic variants of *Cl. parbotulinum* may exist side by side in mass cultures from contaminated foods. Under certain conditions, only nontoxic organisms could be demonstrated. Furthermore, the heating of the food for 30 minutes at 60 C. induced the elaboration of toxin in the beef heart subcultures of two specimens. Whether this phenomenon was due to a coexistence of heat resistant toxic and non-heat resistant atoxic variants, or whether the nontoxic organisms were transformed into toxicogenic variants under the influence of heat, is not known. Since the spores of both the toxic and nontoxic forms, when in pure culture, resisted boiling for 2 to 4 hours, it is unlikely that they would be destroyed by temperatures of 60 C. to 80 C. On the other hand, the failure to induce

18. Geiger, Dickson and Meyer: Pub. Health Bull., 1922, 127, p. 40.

toxin production under the influence of heat when working with pure atoxic cultures indicated that dissociation in this direction did not occur. It is also possible that the presence of *B. subtilis* in the original cultures of the corn specimen may have had some influence upon the formation of toxin. In the case of the pear sample, the effect of heating the organisms in the acid juice was probably one of the factors involved.

Until the chemical mechanism of toxin production in the botulinum group is understood, any explanation of the facts here reported would be exceedingly speculative. In all probability, the absence of toxin in the enrichment cultures depended upon the predominance of atoxic elements which suppressed the toxic ones; and may have been purely a matter of chance.

It is quite possible that the cultures isolated by Reddish<sup>12</sup> from American strains of *Cl. parbotulinum* were really *Cl. sporogenes* as he claimed; but, on the other hand, it is not unlikely that some of them were nontoxic cultures of *Cl. parbotulinum*. He stated that all proteolytic strains must be considered to be contaminated with *Cl. sporogenes*. However, the studies of Bengtson<sup>19</sup> with single cell cultures have definitely proven that pure strains of *Cl. parbotulinum* may be highly proteolytic, a fact amply confirmed by competent workers in this field. Moreover Reddish stated that the American strains were likely to contain *Cl. sporogenes* since they were isolated from badly spoiled materials. In the case of both the pear and corn samples from which nontoxic organisms were obtained, there was no evidence of spoilage other than a butyric odor. The corn sample contained *B. subtilis*, and the pear sample yielded yeast and an organism of the lactobacillus group. *Cl. parbotulinum* was the only anaerobe present.

Furthermore, Reddish believes that the method of isolation used by American workers, which involves heating to 80 C., favors the growth of *Cl. sporogenes*. Hadley expresses the same thought when he assumes that under the influence of heat the normal forms of *Cl. parbotulinum* dissociate into atoxic varieties resembling *Cl. sporogenes*. Although the present study indicates that a temperature of 80 C. favors the development of nontoxic organisms, it is surprising that unheated enrichment cultures were also nontoxic. Hence neither Hadley's theory nor Reddish's explanation could be confirmed.

According to Bengtson<sup>9</sup> and Theiler and Robinson,<sup>10</sup> nontoxic variants occur with *Cl. botulinum* types C and D, a fact confirmed in

19. Hyg. Lab. Bull. 136, 1924.

this laboratory by serologic identification of the toxic and atoxic variants of these types.

Type A strains seem to be more stable as to their ability to produce toxin than strains of types B, C and D. Thus far, only one type A strain which gave rise to nontoxic variants has been found in this laboratory; namely, a culture isolated by Theiler and Robinson in South Africa. Since the toxicogenic forms of the group 5 organisms isolated from the pear and corn samples produced type A toxin, the nontoxic organisms also present should perhaps be considered as variants of type A strains, in spite of the fact that they agglutinate with type B antisera. Recently Townsend encountered nontoxic anaerobes in cans of spinach, experimentally inoculated with earth, which agglutinated with antisera prepared from Cl. parbotulinum type A group 1 strains. (For details the reader is referred to paper 35<sup>20</sup> of this series.) However, it cannot be assumed that these are variants of type A strains because several type B cultures have been found to agglutinate with group 1 antisera.

Fildes<sup>21</sup> has done extensive work with atoxic variants of Cl. tetani. His results differ from those reported here in that his strains displayed variations in morphologic and cultural characteristics as well as in their ability to elaborate toxin.

Little work has been done on the nontoxic sporulating anaerobes, and it is desirable that in the future any observations of this sort be carefully recorded and the factors that might induce them be described. It should be emphasized that in attempting to isolate Cl. parbotulinum, the contaminated material should be heated at 60 C. before enrichment as originally recommended by Dubovsky and Meyer,<sup>22</sup> as well as at 80 C. as advocated by Reddish.

#### CONCLUSIONS

Nontoxic strains which are morphologically, culturally, and serologically identical with Cl. parbotulinum have been isolated repeatedly from contaminated food products. The toxic and atoxic elements present in a sample may be considered as variants of the same organism. The three nontoxic strains isolated in this laboratory from home canned

20. J. Infect. Dis., 1929, 45, p. 87.

21. Brit. J. Exper. Path., 1927, 8, p. 219.

22. J. Infect. Dis., 1922, 31, p. 505.



corn, home canned Bartlett pears, and pickled spiced sardines are agglutinated by antisera of group 5 type B. Nontoxic cultures of anaerobes resembling *Cl. paratubulinum* should not be classified as *Cl. sporogenes* until serologic tests have been made.

Reprinted from

THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, Vol. 45, No. 2, August, 1929, pp. 87-95

## COMPARATIVE STUDY OF NONTOXIC AND TOXIC STRAINS OF CLOSTRIDIUM PARA- BOTULINUM. XXXV

C. T. TOWNSEND

*From the University of California Laboratory for Research in the Canning Industry*

Incubation of experimental packs of spinach made to determine adequate processes for this product resulted in the development of a number of swells in lots which were artificially contaminated with soil. The cans were held for several weeks at room temperature and then incubated at 37 C. for two weeks, followed by storage at 55 C. for a similar period. The spoilage was mainly thermophilic, but a few cans in the lots cooked for the shortest times swelled at room temperature and at 37 C. Strains of *Cl. paratubulinum* were isolated from a number of these cans, although the spinach juice was nontoxic when fed to guinea-pigs in 5 cc. amounts. Other organisms were also recovered which appeared similar to *Cl. paratubulinum* morphologically and culturally. Agglutination, agglutinin absorption and complement fixation tests with serums of all the *Cl. paratubulinum* type strains, however, failed to give any positive results. A description of these organisms, therefore, has not been included in this paper but only those strains which have been proved by serologic methods to be *Cl. paratubulinum*. These are twelve in number and were obtained from seven different cans of spinach.

The main object of this investigation was to determine whether or not any fundamental differences could be found between toxic and nontoxic strains, apart from that of toxin production.

*Serologic Reactions.*—To determine the relationship of the nontoxic strains to type strains of *Cl. botulinum*, agglutination and agglutinin absorption tests were made. Agglutinating serums were prepared (using rabbits) for the following type strains:<sup>1</sup> 38AI; 73AII; 25BIV; 39BV; and 34BVI; and for one of the nontoxic strains, A1A. The titer of each serum was 1:3200, except in the case of 39BV, which ran

Received for publication, April 23, 1929.

1. Cultures of these strains were supplied by the Hooper Foundation for Medical Research. In the symbol for each of these cultures, the first number stands for the serial number of the culture, the letter for the type of toxin which it produces, and the last number for the group to which it belongs. This classification is according to Schoenholz and Meyer: *J. Immunol.*, 10, 1925, p. 1.

as high as 1:12800. Table 1 shows the results of the agglutination and table 2 of the agglutinin absorption tests. No positive agglutinations were obtained with serums of groups 2, 4 or 6, so these are not shown.

These results show that all the strains belong definitely in group 1. There is a slight cross reaction with group 5 in nearly all cases, but this is typical of group 1 strains.

TABLE 1.—AGGLUTINATION TESTS

Antigen	Highest Dilution Positive		
	Serum		
	38AI*	39BV*	A1A
38AI*	1:3200	1:1600	1:3200
39BV*	1:400	1:12800	0
A1A	1:3200	1:1600	1:3200
A1B	1:3200	1:800	1:3200
B2B	1:3200	0	1:3200
C1A	1:3200	1:200	1:800
C1B	1:3200	1:200	1:800
C1C	1:1600	1:800	1:1600
D2	1:3200	1:800	1:3200
E2A	1:3200	0	1:3200
E3A	1:3200	1:800	1:3200
F1A	1:800	1:800	1:1600
G1A	1:3200	1:400	1:1600

\* Toxic type strains

TABLE 2.—AGGLUTININ ABSORPTION TESTS

Antigen	Absorbed Serum Dilution		Unabsorbed Serum Highest Dilution Positive
	Positive	Negative	
SERUM 78A1* ABSORBED WITH F1A			
F1A.....	0		1:1600
38A1*.....	1:40	1:80	1:3200
A1A.....	1:80	1:160	1:3200
C1A.....	1:40	1:80	1:3200
F2A.....	1:80	1:160	1:3200
F3A.....	1:80	1:160	1:3200
SERUM 38A1* ABSORBED WITH A1A			
A1A.....	0		1:3200
38A1*.....	0		1:3200
C1A.....	1:160	1:320	1:3200
F2A.....	1:160	1:320	1:3200
F1A.....	1:80	1:160	1:800

\* Toxic type strains

*Toxicity Tests.*—In order to determine definitely whether or not any toxin was produced, three representative strains, A1A, C1A and E3A, were grown in flasks of beef heart peptic digest liver broth at 37 C. for five days, then held at room temperature. Toxicity tests were made by intraperitoneal injections of 0.5 cc. of each culture into mice on the 5th, 6th, 7th, 9th and 14th days. On the 14th day guinea-pigs also were inoculated with 2 cc. of each culture intraperitoneally. In no case were any ill effects observed. Other attempts to produce toxin with these strains have been made without success. The organisms have therefore

been considered to be nontoxic, but it is not possible to say whether or not they will remain so indefinitely.

*General Characteristics of All the Strains Isolated.*—Gram-positive, motile rods with rounded ends, 0.8 to 1.0 by 3 to 8 $\mu$ . Form clostridia at sporulation, with subterminal, oval spores. Obligate anaerobes, growing best at 37 C. The subsurface colonies vary from lenticular to woolly with lenticular centers, although these are sometimes hidden.

Litmus Milk: reduction of litmus; soft clot; gas; peptonization of one third to two thirds of the casein. The reaction is complete in from five to seven days.

Gelatin: liquefied.

Indol: not formed.

Coagulated egg albumen: blackened and slowly digested.

H<sub>2</sub>S: formed.

Fermentation of Carbohydrates: Medium: Nutrient broth (0.3% beef extract and 0.5% Difco peptone), sterilized in the required amounts in small flasks, was used. 10% solutions of the carbohydrates in distilled water were sterilized by heating for 20 minutes in boiling water, and 1 cc. of the carbohydrate solution was added to each 9 cc. of nutrient broth to give a 1.0% concentration of carbohydrate. The medium was tubed in 3 cc. amounts through sterile funnels into sterile test tubes. The tubes were then stratified with sterile vaseline, heated in boiling water for five minutes, and incubated at 37 C. for 24 hours to test for sterility.

Inoculation: 18 to 24 hour cultures in beef heart peptic digest liver broth were used for inoculation purposes. The tubes of carbohydrate medium were heated in a water bath to a temperature sufficient to melt the vaseline seal, and were then inoculated by means of Pasteur pipets. All tests were made in duplicate. It is essential that absolutely anaerobic conditions be maintained during the inoculation procedure. A large number of tubes were inoculated aerobically, after exhausting in boiling water and then cooling, and were stratified with vaseline after inoculation. It was found that results obtained by this method were absolutely unreliable, varying each time the test was made, and often in duplicate tubes of the same set. It is evident that sufficient oxygen is absorbed by the medium before the tubes are sealed to interfere markedly with the fermentation reactions.

Determination of Reactions: All tubes were incubated with uninoculated controls at 37 C. for four days. The height to which the vaseline plug in each tube was raised was measured and expressed as



TABLE 3.—FERMENTATION OF CARBOHYDRATES

Culture Number	No Car- bonyl- hydrate	Ic- Arabi- nose	Glu- cose	Levu- lose	D- Galac- tose	Lac- tose	Su- crose	Mal- tose	Tre- halose	Rham- nose	Raffi- nose	Inu- lin	Dex- trin	Starch	Salic- in	Glyc- erol	Man- nitol	Dul- citol	Sor- bitol	Ino- sitol
Uninoculated.....	7.4	7.2	7.2	7.2	7.0	7.2	7.4	7.4	7.4	7.2	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.2	7.4	7.4	7.2	7.4
A1A.....	6.8	6.6	6.8	5.0	5.2	6.8	6.4	5.0	5.0	6.4	6.8	6.6	5.0	5.2	6.4	5.2	6.6	6.6	5.0	6.4
	B	B	B	2.0	B	B	2.2	2.0	B	B	B	2.0	1.7	B	5.5	B	3.8	B	3.8	B
A1B.....	6.8	6.8	5.4	5.4	6.8	6.8	6.6	5.2	5.4	6.6	6.8	6.8	5.8	5.3	6.6	5.4	6.8	6.8	6.4	6.8
	B	—	—	1.8	B	B	—	1.3	1.0	B	B	B	0.5	0.8	—	4.7	B	B	B	B
B2B.....	6.8	6.8	5.4	5.4	6.8	6.4	6.6	5.0	5.0	6.4	6.4	6.4	5.0	5.6	5.2	5.2	6.6	6.6	5.2	6.6
	B	B	B	2.5	0.8	B	B	1.0	1.8	B	B	B	0.8	0.4	B	4.0	—	—	2.7	B
C1A.....	6.6	6.4	6.4	5.4	6.4	6.4	5.4	5.6	5.3	5.6	6.4	6.6	5.4	5.2	6.4	5.4	6.4	6.6	6.0	6.8
	B	B	B	0.5	B	—	—	2.0	0.7	—	B	B	0.2	1.0	0.5	1.8	B	0.8	B	B
C1B.....	6.6	6.4	6.4	5.2	5.3	6.4	6.6	5.2	5.2	5.4	6.4	6.6	5.1	5.1	5.2	5.4	6.4	6.4	6.6	6.6
	—	B	B	0.5	B	—	B	1.0	0.3	—	B	B	1.0	1.0	0.5	3.0	B	B	1.0	B
C1C.....	6.5	6.4	6.6	5.4	5.2	6.4	6.4	5.2	5.2	6.6	6.4	6.6	5.6	5.2	5.4	5.4	6.4	6.4	6.2	6.6
	—	—	B	0.5	B	B	B	0.7	0.8	B	—	—	0.3	0.8	0.5	1.7	B	B	2.0	B
D2.....	6.6	6.6	6.6	5.4	5.0	6.6	6.6	5.8	5.2	6.6	6.4	6.6	5.3	5.2	6.6	5.3	6.6	6.4	6.4	6.8
	B	B	B	2.0	2.8	—	B	—	0.8	B	1.6	B	1.0	1.3	B	4.7	B	—	0.5	—
E2A.....	6.6	6.6	6.6	5.0	5.2	6.6	6.6	5.0	5.0	5.0	6.6	6.4	4.8	5.6	5.0	5.0	6.6	6.6	5.0	6.4
	B	B	B	1.2	B	B	B	0.7	1.8	B	B	B	B	B	B	2.4	—	—	1.5	B
F3A.....	6.6	6.2	6.4	4.8	5.1	6.6	6.4	5.0	5.1	5.3	6.4	6.6	5.2	5.2	5.2	5.6	6.4	6.4	5.3	6.6
	B	B	B	3.4	3.0	B	B	0.4	4.0	3.2	B	B	2.7	1.6	0.2	5.5	B	B	6.5	B
E3B.....	6.6	6.4	6.4	5.2	5.4	6.6	6.8	5.6	5.2	5.6	6.6	6.8	5.2	5.2	6.4	5.4	6.6	6.4	5.4	6.8
	B	B	B	1.0	B	B	B	3.5	1.3	B	B	B	1.2	1.0	B	7.2	B	7.0	B	B
F1A.....	6.6	6.5	6.6	5.4	5.4	6.6	6.6	5.2	5.5	6.6	6.6	6.6	5.2	5.0	6.6	5.4	6.6	6.4	6.2	6.6
	B	B	B	1.5	0.5	B	B	0.2	1.2	B	B	B	1.0	1.6	B	2.0	B	B	0.9	B
G1A.....	6.6	6.6	6.6	5.3	5.6	6.5	6.6	5.3	5.6	6.6	6.6	6.6	5.0	5.8	6.6	5.6	6.6	6.6	6.4	6.6
	—	—	—	1.5	B	B	—	1.7	0.7	B	—	B	0.5	B	B	2.2	—	B	B	B
33A1 (toxic).....	6.6	6.6	6.6	5.2	5.2	6.6	6.6	5.4	5.3	6.6	6.6	6.6	5.3	5.2	5.4	5.0	6.6	6.6	5.2	6.6
	B	B	B	1.6	1.9	B	B	1.7	1.5	B	B	B	0.5	B	0.5	4.6	B	B	3.5	B

cm. of gas formed (the tubes were 11 mm. inside diameter and contained 2.5 to 3 cm. of medium). The  $P_H$  values were determined by the addition of a suitable indicator and comparison with a color standard in a comparator block.

Table 3 gives the fermentation reactions of all strains, together with those of a toxic group 1 strain, 33AI, for comparison. For each organism the figures in the first row are the  $P_H$  values and in the second row are cm. of gas (B stands for bubble, and — for no gas).

Most of the strains check fairly well with the type strain, 33AI, in their reactions, all fermenting glucose, levulose, maltose, trehalose, dextrin, starch and glycerol. There is a good deal of variation in their ability to utilize salicin and sorbitol. Some give slight reactions with sorbitol, producing gas but little or no acid. A few strains are more saccharolytic than 33AI, being able to ferment sucrose and rhamnose, although the fermentation of rhamnose is not constant. There are no consistent differences, however, which would serve to separate the nontoxic from the toxic strains.

*Formol Titrations.*—The rate of peptone digestion for all strains was determined by the formol titration method,<sup>2</sup> using the following medium: 4% peptone (Difco); 1% beef extract and 0.5% NaCl. The results are shown in chart 1. All the figures are given with the titration of the blank subtracted. The average values\* for all group 1 toxic strains are also shown for comparison.

The results show that there is comparatively little difference between the various strains in their ability to attack peptone, and in the amount of products of digestion formed. If anything, the toxic strains, on the average, are slightly more peptolytic than the nontoxic.

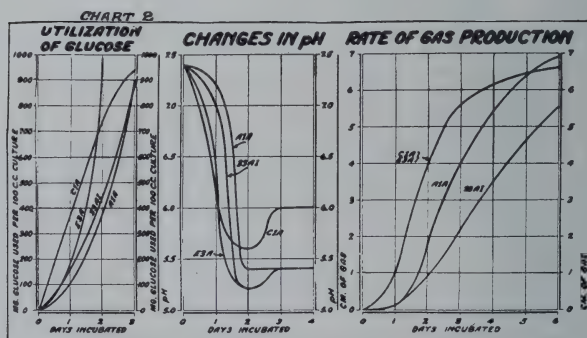
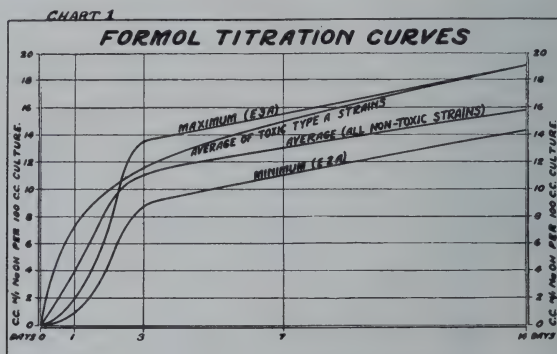
*Glucose Utilization.*—It was found by McAlpine and Slanetz<sup>3</sup> that the abortus-melitensis group of bacteria could be separated into two distinct parts on the basis of the ability of the different strains to utilize glucose as a source of energy. It was thought that it might be possible to separate the toxic from the nontoxic strains of Cl. paratuberculosis in the same manner. Preliminary tests were made using three representative nontoxic strains, A1A, C1A and A3A, together with a typical group 1 toxic strain, 33AI. A number of tubes, each containing 5 cc. of beef extract glucose broth (1% peptone (Difco); 1% beef extract; 1% glucose and 0.5% NaCl) stratified with vaseline, were inoculated

2. For principles involved see Brown, J. H.: J. Bact., 1923, 8, p. 255.

\* Furnished by J. B. Gunnison.

3. J. Infect. Dis., 1928, 42, p. 73.

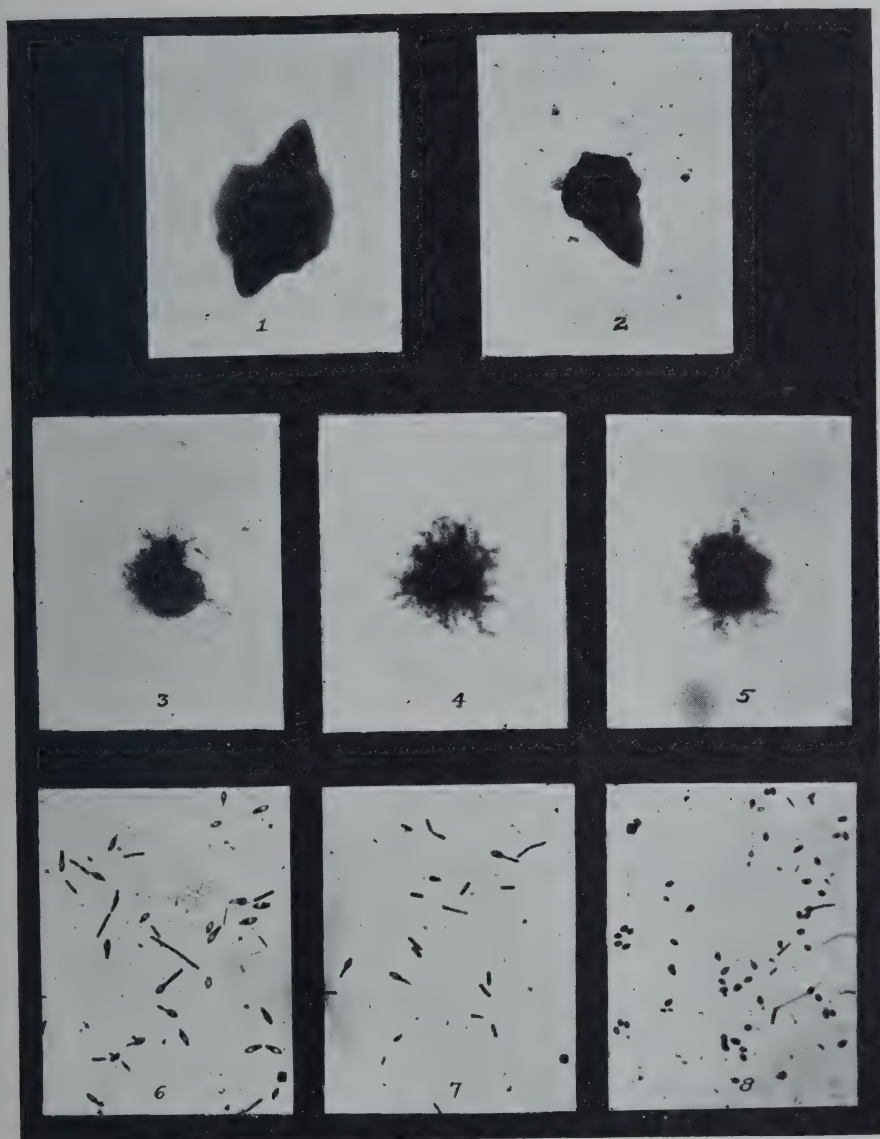
from a 24-hour culture of each strain, and incubated at 37 C. Each day duplicate tubes of each strain were removed, the gas formed measured and the  $P_H$  tested. The glucose content was then determined by the Somogyi modification of the Schaffer-Hartman method,<sup>4</sup> using the sodium tungstate method of Folin and Wu<sup>5</sup> for the precipitation of proteins. The results are presented in the accompanying graphs (chart 2).



It does not appear that there is sufficient difference in the rate of glucose consumption of the toxic and the nontoxic strains to make this method of any value for differentiating them. In every case gas is produced more rapidly by the nontoxic strains than with 33AI, but the changes in  $P_H$  values are nearly the same. 33A apparently produces alkaline products to balance the  $P_H$  of the medium more rapidly than the other strains, the final  $P_H$  also being considerably higher.

4. J. Biol. Chem., 1926, 70, p. 606.

5. Ibid., 1919, 38, p. 81.



#### EXPLANATION OF PLATE

All colonies are magnified 40 times, and all bacterial cells 700 times.

1. Colony of A1A, from a 48 hour culture in a shake tube.

2, 3, 4 and 5.—Different colonies of E3A from the same shake tube. 24-hour culture.

6 and 7—E3A and A1A from 4-day broth cultures, Gram stain.

8. C1A, showing spores; 10-day culture in casein digest; stained with carbol fuchsin.



*Heat Resistance Studies.*—Preliminary heat resistance determinations were made for three strains A1A, C1A and E3A, using the method of Bigelow and Esty.<sup>6</sup> The spores were prepared by growing the organisms in flasks of casein digest (stratified with vaseline) for 10 days at 37 C. The growth in each case was then centrifugated, washed once in sterile tap water, and suspended in the standard phosphate solution (mixture of 1/15 M  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  to give a  $\text{P}_\text{H}$  of 7.0). All the runs were made in boiling water, three tubes of each suspension being removed at each time interval. The results are summarized in table 4.

The survival of spores of C1A for 420 minutes in boiling water is the maximum resistance so far recorded for a *Cl. parabotulinum* strain heated in the standard phosphate solution. Previous studies by other workers have given a maximum resistance of 330 minutes under the same conditions. The fact that only one tube out of three came through

TABLE 4.—HEAT RESISTANCE OF STRAINS A1A, C1A AND E3A AT 100 C.

Culture Number	Number of Spores per Ce. of Suspension*	Survival		Destruction Time, Minutes
		Time, Minutes	Number Tubes Positive	
A1A.....	50,000	60	3	90
C1A.....	100,000 million	420	1	450
E3A.....	5 million	150	3	180

\* 2 cc. suspension per tube

at 420 minutes, and only one at the previous time interval, 360 minutes, would indicate that among many millions of spores only a very few were relatively highly resistant. The comparatively low resistance of the other two strains may be due to the small number of spores heated.

#### SUMMARY

Twelve nontoxic strains of *Cl. parabotulinum* were isolated from seven swelled cans of spinach which had been artificially contaminated with soil at the time it was packed. All the strains studied were proved by serologic, biochemical and cultural tests to belong to group 1 (Schoenholz and Meyer<sup>1</sup>).

The differences in the biochemical reactions between the toxic and nontoxic strains are not sufficiently marked for purposes of classification. On the average the nontoxic are more saccharolytic and less proteolytic than the toxic strains, but in particular cases this does not hold. There are marked differences in saccharolytic powers among the non-

6. J. Infect. Dis., 1920, 27, p. 602.

toxic strains, and there is sufficient variation in the rate of glucose utilization to indicate that their energy requirements are by no means the same. It is possible that this test might be of value for classification purposes.

The resistance to heat of three nontoxic strains varied from 90 to 420 minutes (survival time) at 100 C. when heated in the standard phosphate solution.

#### CONCLUSIONS

It is not possible to differentiate toxic from nontoxic strains of Cl. parobotulinum by the usual cultural, biochemical and serological methods.









## EUROPEAN STRAINS OF CL. BOTULINUM XXXVI

K. F. MEYER AND J. B. GUNNISON

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco*

American workers who have studied the various strains of *Cl. botulinum* and *Cl. paratubulinum* isolated from foods, soil, etc., have frequently doubted the purity of their strains since the cultural and biochemical findings did not correspond to the original description of Van Ermengem. There exists no doubt that the European strains of *botulinus* differ fundamentally from those studied in the United States, since the organisms found by Römer, Ornstein, Semerau and Noack, Bitter, Bourmer and Doetsch,<sup>1</sup> always described as nonproteolytic and non-putrefactive organisms, were readily identified with the Van Ermengem bacillus. Unfortunately these cultures are not available for comparison. However, a culture which most nearly represents the original *Bacillus botulinus* was, according to Bengtson and independent studies of the writers, first described by the Medical Research Committee of Great Britain<sup>2</sup> as Lister culture 94.<sup>3</sup> This organism is unquestionably a species of the Van Ermengem group of microorganisms. In fact, as a result of certain inquiries and comparisons the senior author considers the Lister culture 94 to be a transplant of the strain originally isolated by Ornstein<sup>4</sup> in 1913. It will be remembered that this microbe was serologically identical with the Van Ermengem type. However, since Kendall, Day and Walker<sup>5</sup> secured with the aid of the one cell technic from six proteolytic American cultures several strains which behaved biochemically like the Van Ermengem type, there exists the remote possibility that the Lister strain no. 94 is merely a variant gradually developed in the test tube from an ovolytic and sarcolytic strain. Thus one felt the need of a comparative study of

Received for publication, April 23, 1929.

1. Meyer: *Botulismus*, Handb. d. path. Mikroorganismen, 1928, 4, p. 1349, for references.

2. Special Report Series no. 39, 1919, p. 26.

3. According to a statement in the catalogue of the National Collection of Type Cultures, Medical Research Council Special Report Series, no. 64, 1922, p. 10, *B. botulinus* no. 94 is given as a type A, and 95 as a type B. Repeated tests by Miss Bengtson (*Hyg. Lab. Bull.* 136, p. 27) and others have shown that no. 94 is nonovolytic and a type B strain, while no. 95 is a proteolytic type A strain. In a culture received in 1927 both 94 and 95 contained a type B toxin.

4. *Ztschr. f. Chemotherap.*, 1913, 1, p. 458.

5. *J. Infect. Dis.*, 1922, 30, p. 177.

strains of *Cl. botulinum* recently isolated on the European continent. A desire for more detailed information became imperative when Zeissler,<sup>6</sup> the German expert on anaerobes, repeatedly described as prototypes of the botulinum organism a group of anaerobes which is strongly ovolytic and indistinguishable from the American strains. In a study of over 2,000 strains of anaerobes he fails to record the Van Ermengem bacillus. One must assume that he either does not accept the Van Ermengem species as valid or in recent years only ovolytic types of *Cl. botulinum* have been secured in Europe by Zeissler's blood-plate method. The published data contain no histories of the strains he has studied.

The conflicting reports deserved further investigation and the writers have therefore requested transplants of every culture of *Cl. botulinum* which has been isolated during the past 8 years. With a few exceptions such cultures have been gladly furnished and are gratefully acknowledged. A collection of 162 strains has been assembled. Six cultures have been obtained either directly from Europe or from specimens of European origin.

Five of the six strains are morphologically and biochemically identical with the American *Cl. paratubulinum* strains with the sole exception that they fail to ferment salicin. They are strongly ovolytic and they grow well in 6%, but not in 8% NaCl. The spores have a thermal death time of from 1 to 2 hours at 100 C. The histories of these strains are briefly as follows:

*Strain 134.*—Type A, serologic group 2, obtained in October, 1922, from William G. Savage, Weston-Super-Mare and National Institute for Medical Research, Hamstead, London; originally isolated by P. Bruce White, bacteriological laboratories of the University of Bristol, from a specimen of wild duck paste which was involved in the Loch Maree outbreak of botulism, August 14-22, 1922.<sup>7</sup>

*Strain 154.*—Type A, serologic group 2, labeled "Davos." Obtained from and originally isolated by Prof. W. Silberschmidt, Hygienische Institut der Universität Zürich from a specimen of American canned beef which in 1920 caused the death of a young man at Davos. This strain has been studied by M. Francillon.<sup>8</sup>

*Strain 155.*—Type A, serologic group 2, labeled "Frauenfeld," obtained from and originally isolated by Prof. W. Silberschmidt from a ham which in 1920 poisoned 13 people (2 fatally) in the vicinity of Frauenfeld. The outbreak has been described by H. R. Stockar<sup>9</sup> and the organism has been investigated by M. Francillon.

*Strain 161.*—Type A, serologic group 1, isolated by George E. Coleman from a sample of soil originally obtained from Prof. W. von Gonzenbach, Federal Polytechnic High School, Zürich. The specimen contained also *Cl. tetani*, *Vibrio septique*, *Cl. welchii* and *Cl. oedematiens*.

*Strain 169.*—Type B, not agglutinated by American type sera, isolated from canned "onions" (shalots) commercially packed in Naples, Italy.

*Strain 162.*—The sixth culture, which differs from the others in many ways. Type B, ultra-specific. Obtained February, 1928, from Prof. Ed. Boecker, Institut für Infektionskrankheiten, "Robert Koch," Berlin, who had isolated it in 1927 from a botulinogenic ham.

6. Handb. d. path. Mikroorganismen, 1928, 5, p. 1097; Centralbl. f. Bakteriologie, 1, O., 1928, 110, p. 24.

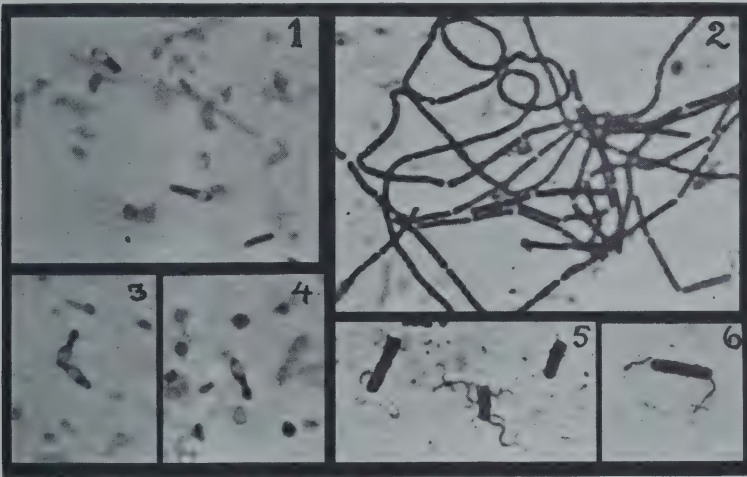
7. Gerald Leighton: Botulism, 1923, p. 186.

8. Arch. f. Hyg., 1925, 95, p. 121.

9. Zurich Medical Thesis, 1923.

Since preliminary tests indicated that this strain resembled the Van Ermengem organism a detailed study which is here reported was made.

*Morphology:* In stained and hanging drop preparations the organism appeared as a large rod with rounded ends, as a rule slightly longer ( $4$  to  $10\mu$ ) than the forms commonly noted in the cultures of the proteolytic type A and B strains. Although the Gram reaction was positive, it became negative very early and bizarre, slightly granular "shadow forms" were always present in cultures older than 24 hours. Long filamentous aggregations were occasionally observed (plate fig. 2).



The morphology and colony types of European strains of *Clostridium botulinum* type B (van Ermengem).

Figs. 1, 3 and 4.—Sporulating rods in beef heart mash, Gram stain,  $\times 1300$ .

Fig. 2.—Vegetative forms in glucose-gelatin, Gram stain,  $\times 1300$ .

Figs. 5 and 6.—Flagella on vegetative forms in 16- to 18-hour broth culture, Zettnow's stain,  $\times 1300$ .

Spore formation in the customary anaerobic media was scanty and frequently could not be detected in microscopic preparations. Oval or egg shaped spores, which rarely appeared before the 5th day in brain and peptic digest medium, were terminal (fig. 1) or subterminal and the rods were slightly swollen (figs. 1, 3 and 4). Free spores in older cultures were rare and appeared as oval bodies. In a hanging drop preparation the motility was sluggish but under anaerobic conditions in a capillary tube the rods were actively motile. Short rather thick flagella were demonstrated with difficulty (Zettnow stain); the



exact number has so far not been determined but was estimated at less than 10, in some instances only 2 (figs. 5 and 6).

*Cultural Characteristics:* The organisms grew less readily in the various culture mediums than the paratubulinum strains. The addition of casein-digest materially improved the growth.

*Colony Formation:* In liver agar shake cultures very small discoid colonies were formed which in the course of a few days were transformed into rhizoid woolly specks on account of the rapid spreading and enveloping action of the polar fluffs. Consequently the fluffy colonies showed a dense nucleus-like center. A large amount of gas was invariably produced and pronounced fragmentation was always present. Heavy seedings were required in order to obtain growth in this medium.

On glucose-sheep blood agar plates the colonies developed as small grayish lens shaped discs. The surface colonies were discrete, leaf-like, dull and granular with serrate edges; the media remained unchanged and the absence of hemolysis was particularly noteworthy.

In gelatin poured plates or in deep shake cultures small flat or globoid whitish to grayish colonies appeared within 3 to 4 days. They consisted of a network of radially arranged bacterial threads which projected over the surface. The dark brownish center liquefied within 8 to 10 days and showed a clumpy aggregate of bacterial masses.

*Action on Differential Mediums:* The most striking feature of the cultural tests in cooked meat, Loeffler's serum, coagulated eggwhite and in gelatin was the exceedingly slight proteolytic action irrespective of the good growth and the production of very large quantities of gas. The growth was always promptly precipitated. Gelatin was softened beginning the 7th day of cultivation and complete liquefaction required at least 3 weeks. The foamy culture cleared rapidly and whitish flocculi sedimented to the bottom leaving the gelatin clear above. Kept at 20 C. and judged by the evolution of gas growth continued for 2 weeks or longer. Hibler's brain mash supported good growth with gas production but without discoloration or blackening of the medium. A strong penetrating butyric acid odor was evolved in all fermenting cultures. The absence of a putrid odor was noteworthy. In milk the growth was slight without any change in reaction or consistency.

*Biochemical Action:* In 4% Difco-peptone the following Sørensen's formol titration figures were obtained:<sup>10</sup>

- 1st day.—0.25 cc. of N/1 NaOH was required to neutralize 100 cc. of medium.
- 3rd day.—1.00 cc. of N/1 NaOH was required to neutralize 100 cc. of medium.
- 7th day.—1.50 cc. of N/1 NaOH were required to neutralize 100 cc. of medium.
- 14th day.—2.00 cc. of N/1 NaOH were required to neutralize 100 cc. of medium.

Indol was not formed in casein-digest medium or in peptone solutions. Glucose, levulose, sucrose, maltose, glycerol, adonitol and dextrin in a 0.3% Liebig's extract—0.5% Difco peptone broth were regularly fermented. Large amounts of gas were produced and the  $P_H$  of the medium was reduced at the end of the fermentation to  $P_H$  5.2 to 5.4.

*General Characteristics:* The organism behaved like a strictly obligate anaerobe. Beef heart cooked medium required stratification with vaseline to secure growth. Surface cultivation on plates held in anaerobic jars was con-

siderably more difficult than with the proteolytic strains. Growth was equally good at 37 C. and 20 C., although a definite lag of 24 hours was noted at the lower temperature. At 10 C. no growth took place. Sporulation was definite at 20 C. and usually absent at 37 C.

Within a  $P_H$  range of 6.6 to 8.0 and a concentration of peptone of from 10 to 20% growth was uniformly vigorous. A 25% peptone concentration was inhibitive. The organisms tolerated a concentration of 6 but not 8% sodium chloride in veal infusion broth. Excellent growth and toxin production was noted in minced ham in tap water with a NaCl content of 1% while in dialyzed minced ham with less than 0.1% NaCl no growth was recorded. It is not unlikely that the dialysis not only removed the electrolytes but also other important growth accessory factors.

**Spore Resistance:** Since sporulation of the strain was slight and irregular only a few tests have been made. The resistance was very low. A suspension of

TABLE 1.—SUSCEPTIBILITY OF VARIOUS ANIMALS TO CL. BOTULINUM TYPE B

Species of Animal	Weight, Gm.	Toxin Approximate MLD for Guinea-Pig	Mode of Administration	Susceptibility
Guinea-pig.....	380	1 (0.03 cc.)	Subcutaneous	Death in 96 hours
Guinea-pig.....	335	2	Feeding	Death in 96 hours
Rabbit.....	2,420	20	Subcutaneous	Death in 3 days
Rabbit.....	2,435	60	Subcutaneous	Death in 6 days
Rabbit.....	2,020	100	Feeding	Symptoms 2nd day, death 6th day
Mouse.....	19	0.5	Subcutaneous	Symptoms 48 hours, death 72 hours
Mouse.....	21	2.0	Feeding	Symptoms 48 hours, death 72 hours
Rat.....	Approximately 250	3.0	Subcutaneous	No symptoms
Rat.....	Approximately 250	30	Subcutaneous	Death in 11 days
Rat.....	Approximately 250	300	Subcutaneous	Death in 12 days
Macacus monkey...	2,750	100	Feeding	Death in 24 hours
Pigeon.....	360	300	Subcutaneous	Death in 4 days
Pigeon.....	425	300	Feeding	Death in 5 days
Chicken.....	1,500	10,200	Subcutaneous	No symptoms
Chicken.....	1,450	19,500	Feeding	No symptoms
Cat.....	Approximately 3,200	300	Subcutaneous	No symptoms
Cat.....	Approximately 4,100	10,500	Subcutaneous	No symptoms
Dog.....	Approximately 2,200	900	Subcutaneous	No symptoms

spores produced in a 17-day culture of peptic digest gelatin survived an exposure of 5 minutes at 80 C. A brain mash culture with good sporulation was sterilized within 5 minutes at 80 C.

**Pathogenic Action:** A weak toxin which killed a guinea-pig in a dilution of 1:100 in 48 to 96 hours was formed in Van Ermengem's pork infusion broth, pea-peptic digest-gelatin, veal infusion, liver and casein-digest broth. The strongest poison thus far obtained developed in beef heart mash and minced ham mediums. The MLD for a guinea-pig was 0.03 cc. and for a mouse of 20 gm. 0.001 cc.

A number of comparative tests as to the susceptibility of animals to the toxin of strain 162 have been made. The results are summarized in table 1.

The susceptibility of rats and on the other hand the marked immunity of cats deserve consideration. Furthermore, it is interesting to note that relatively small doses prove fatal following oral administration; the minimum feeding doses for guinea-pigs, rabbits and mice rarely exceeds twice to three times that of the subcutaneous.

**Immunologic Relations:** The toxin of strain 162 was neutralized by a type B antitoxin produced with American type B strains. Serologically the strain was ultraspecific in the agglutination and complement fixation test. It was neither

agglutinated by the type serums 1 to 7 nor by a serum prepared with the Lister strain 94. Moreover, serum prepared from this strain failed to clump any of the cultures available in this laboratory although it reacted in high dilution with the homologous organism.

#### DISCUSSION

The data here presented conclusively prove, contrary to the views of Reddish, that proteolytic or ovolytic strains producing a botulinum toxin have been isolated in Europe. In the same group belongs the Lister strain 95 (Bengtson, 3) which in all probability is identical with the Darmstadt strain, isolated from home canned string beans by Gaffky and Landmann as early as 1904. Four of these strains are neutralized by type A and one by type B antiserums. Since they are strongly proteolytic, producing powerful odor in meat medium, and forming spores in a clostridial position with a high thermal death time, they are representatives of the species *Clostridium parabolinum* as defined by Bengtson.<sup>11</sup> It is furthermore of interest to note that the origin of one of the European cultures (strain 154) is attributed to American canned beef. In this connection it is recalled that a number of people attempted to connect the occurrence of *Cl. parabolinum* in a jar of wild duck paste responsible for the Loch Maree outbreaks prepared in Great Britain with the United States. It was pointed out that the glass jar in which the paste was canned and sterilized, although it originated in Holland had been packed in American straw or some similar type of packing material! The demonstration of *Cl. parabolinum* type A in European soil (strain 161), and the well known fact that the botulinum bacillus secured by Kempner and Pollack in 1896 from hog manure was culturally identical with the Darmstadt strain and in all probability a type A strain, should now remove this stigma. The relative scarcity of these strains in the soil of the European Continent (for example 3% in Scottish soil, Leighton and Buxton) in contrast to the wide distribution on the American Continent may also in part explain the rarity of botulism due to home or commercially canned vegetables or meat products irrespective of the fact that sterilization processes are still in vogue which will not destroy the highly resistant spores of this species. The recent recognition of botulinum toxin type B in commercially packed Italian shalots deserves consideration by European food officials. On the other hand it is now proved that the *Cl. parabolinum* may grow in a pickled and smoked ham without producing readily recognizable alterations in texture, odor

11. Hyg. Lab. Bull. 136, 1924.

and appearance. Stockar<sup>9</sup> (p. 22) reports that only one patient noted a flat taste ("fader Geschmack") of the poisonous ham. Furthermore, the Frauenfeld outbreak represents an example of a type A intoxication with a low mortality (15%) which cannot be attributed to the low toxicity of the strain but to the concentration of the poison in the flesh adjacent to the bone. The factors responsible for these conditions have already been discussed by the senior author<sup>1</sup> in a recent publication.

Strain 162, by far the most interesting organism of the European collection, corresponds in its cultural and biochemical reactions with the descriptions given by Van Ermengem for the Elzevelles culture. Aside from the Lister strain 94 with which it shares a number of major characteristics it is the only carefully studied strain which produces a toxin neutralizable with type B antisera and yet is nonsarcolytic and nonovolytic. It is a true representative of the genus *Clostridium botulinum* in accordance with the designation proposed by Bengtson. Any one who is thoroughly acquainted with the American strains would at first classify this culture with the species *Cl. botulinum* type C on account of its strikingly low peptolytic properties (low Sørensen figures). However, it differs from these bacteria by its ability to ferment saccharose. With the Lister strain 94 it has in common the morphology, the production of a type B toxin and the fermentation of adonitol. On the other hand it is less peptolytic and cannot utilize inositol. The growth of both strains is frequently scanty and erratic and one can now fully appreciate the difficulties which the majority of European workers (see Bitter) must have encountered in the isolation and purification of such strains. In fact the infrequent (10 cultures in 112 single or group intoxications) cultural demonstration of the toxin producing microorganism in the causative food is now in part explained. A specimen of botulinogenous food which aside from the specific bacillus contains various other anaerobes may furnish a toxic enrichment culture but the isolation of a pure culture will remain a matter of chance. In the mixtures of sporulating anaerobes strains like 162 are readily overgrown, the colonies in the deep agar shake culture or the blood-plate possess no striking characteristics and one cannot resort to selective enrichment on account of the low thermal death time of the spores. Even the purified cultures may without frequent transplantation die out or become nontoxic either through the gradual predominance of atoxic variants or through overgrowth by the common *Cl. sporogenes*. One cannot but admire the skillful isolation of the first *Bacillus botulinus* by Van Ermengem. This achievement



has in recent years only been matched by the work of Bengtson on *Cl. botulinum* type C and of Robinson on *Cl. botulinum* type D.

Strains similar or probably identical with strain 162 have frequently been associated with botulism due to products which have never been subjected to heat such as cured and smoked hams (Van Ermengem, Römer, Schumacher, Ornstein, Bourmer and Doetsch, Boecker) and pickled fish (Madsen, Bitter). The low thermal death time would obviously exclude the possibility of their survival in any animal or vegetable product which is sterilized. As to the distribution of the nonovolytic *Cl. botulinum* type B in nature nothing definite is known. Since the various ham and fish outbreaks occurred in various sections of Central Europe one may surmise that it is widely distributed. Furthermore, the frequent occurrence in hams rather forcibly suggests an intestinal habitat with possible selective localization in the bone-marrow. A search for this anaerobe in soil or manure specimens will probably remain futile until a selective enrichment medium has been devised. Repeated attempts made in this laboratory to isolate the type B strains present in mixed toxic cultures of soil secured from Belgium, England and Switzerland have failed to yield the suspected nonovolytic *Cl. botulinum*. In the many thousands of samples of soil, vegetable, sewage, manure and food of American origin studied during the past 8 years the writers have never found any indication of a botulinum toxin producing anaerobe which culturally and biochemically acted like strain 162. Although the results are very suggestive it would not be safe to conclude that the organism is not present on the American continent. Since the genetic interrelationship of the four types A, B, C and D of *Cl. botulinum* and parobotulinum is still unknown it appears highly desirable that the ecological studies on the botulinum organisms which were started by Burke under most auspicious circumstances be continued.

The ham strain 162 shares with the other type B *Cl. botulinum* and parobotulinum organisms the property of being a poor toxin producer, a fact first established by the senior author, then by Burke and later confirmed by Hetsch. Moreover, the most potent poison was formed in minced ham. One may ask in this connection the pertinent question: does this low toxicity perhaps offer an explanation for the low mortality (11 to 22%) in the German group and single cases of botulism due to ham, bacon and similar meat products? Since comparative quantitative toxin determinations of the causative food are not available it is impossible to answer this query directly. The mortality depends not

so much on the botulinum type which grew in the food as on the consistency, moisture content and the mode of preservation of the product. Thus, an organism like *Clostridium botulinum* type B in pickled fish induced a mortality of 75 to 100% (Bitter). In these cases the diffusion of the poison favored the ingestion of a fatal amount while in the dry smoked ham or meats in which the harmful material remained localized in small areas, the chances of consuming a lethal dose of toxin is considerably less than in a soft, moist pickled or canned product. In addition to these conditions the absorbability of the poison plays a rôle. The observations made with strain 162 are definite at least as far as they apply to laboratory animals. The minimum lethal dose administered by mouth rarely exceeded two to three times that required to poison an animal by the parenteral (subcutaneous) route. According to Lippmann the minimal feeding dose for a mouse is 1600 times the subcutaneous, while Bronfenbrenner and Schlesinger found for guinea-pigs a ratio of 1000:1 and Bengtson for chickens a ratio of at least 10:1. The fact of the low toxicity of the Cl. botulinum type B strain can obviously be nullified more or less by the ready absorption of the poison from the intestinal tube. One may therefore surmise that the low mortality in the German outbreaks due to ham is caused by other factors than the low toxicity of the strains. Further investigations are, however, required to support this contention.

Finally attention must be called to the susceptibility of different animals to the toxin of strain 162. As already noted by Van Ermengem slight differences exist in the susceptibility of the mouse, guinea-pig, rabbit, and monkey when the weight of the animal is considered. The pigeon is about 300 times as resistant as the guinea-pig, while the chicken, dog and cat can withstand very large doses. Rats although generally reported to be slightly susceptible were readily poisoned on subcutaneous injection with 30 guinea-pig MLD. With this exception the German ham strain, a nonovolytic type B Cl. botulinum, corresponds in its action on animals with the Ellezelles strain.

#### SUMMARY

A comparative study of six purified strains of organisms isolated from several food specimens and one sample of soil obtained from Europe has revealed the following facts:

Cl. paratubulinum type A strains indistinguishable from the American strains and the Lister strain 95 have been isolated from botu-

linogenous food products and a soil specimen. A type B strain of *Cl. parabotulinum* has been obtained from Italian commercially canned shalots.

A non-ovolytic type B strain of *Cl. botulinum* recovered from a ham in Germany resembles morphologically, culturally and biochemically the original Ellezelles strain described by Van Ermengem and the various other strains studied by Schumacher, Ornstein, Bitter, Semerau and Noack, Bourmer and Doetsch and others. It differs from the Lister strain 94 by its inability to utilize inositol, its lower peptolytic properties, the production of a relatively weak toxin, and the serologic ultraspecificity. The thermal death time of the spores of this organism is less than 5 minutes at 80 C.







Reprinted from  
THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, Vol. 45, No. 2, August, 1929, pp. 106-118

## SOUTH AFRICAN CULTURES OF CLOSTRIDIUM BOTULINUM AND PARABOTULINUM. XXXVII

WITH A DESCRIPTION OF CL. BOTULINUM TYPE D, N.SP.

K. F. MEYER AND J. B. GUNNISON

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco*

In accordance with the principles outlined in the preceding paper and in order to extend the ecological study of the representatives of the botulinum group, a series of cultures secured from South Africa has been studied. In 1920<sup>1</sup> and later in 1927 Theiler and his associates<sup>2</sup> reported the isolation of a botulinum-like organism from the toxic carion material which produced lamsiekte, a fatal cattle disease in Bechuanaland, Orange Free State, and in the northwest portion of the Cape Province. The bacillus was described as "*Clostridium parabolulinum bovis*" and the disease lamsiekte was renamed "parabotulism." Subsequently Theiler and Robinson<sup>3</sup> published a description of an organism of the "parabotulinum" group isolated from the carcass of a dead rat found in the hay stack of a stable and supposedly connected with spinal paralysis of mules or equine parabotulism. Although the two organisms resembled Cl. botulinum type C in their morphological and cultural characteristics, their toxins were not neutralized by a type C antitoxin prepared by Graham (see Theiler and Robinson). Furthermore, the lamsiekte or Cl. parabotulinum bovis antitoxin failed to protect against the toxin of the equine parabotulinum. In addition other differences were recorded. Thus horses will resist larger quantities of parabotulinum toxin than cattle, while for the parabotulinum equi poison the reverse is said to be the case. These reports left no doubt that the South African workers had discovered two very interesting species of the botulinum group which deserved a comparative study by the methods developed in this laboratory. Through the courtesy of P. J. du Toit and E. M. Robinson of the department of agriculture, Division of Veterinary

Received for publication, April 23, 1929.

1. J. Dept. Agric., Union of South Africa, 1920.

2. 11th and 12th Reports of the Director of Veterinary Education and Research, Dept. Agric., Union of South Africa, pt. 2, 1927, p. 1201. Ztschr. f. Infektionskr. d. Haustiere, 1927, 31, Hft. 3, p. 165.

3. South African J. Sc., 1926, 23, p. 526. Rev. gén. de méd. vét., 1927, 36, p. 193; and 13th and 14th Report of the Director of Veterinary Education and Research, Dept. Agric., 1928, pt. 1, p. 45.

Services, Onderstepoort near Pretoria, three separate shipments of cultures and antisera have been received. It is indeed a privilege to acknowledge again the opportunity which was thus afforded the writers to compare these cultures with the various species and representatives of the botulinum group. Unfortunately the results have in part been contradictory to the published records and it appears desirable to compare additional specimens. However, further requests for cultures have been denied since the South African workers desired to protect their priority rights. The writers abide by this decision and merely regret that they were not permitted to assist in the unraveling of the mysteries which continued to surround the problem of South African botulism. With this thought in mind the observations are here recorded. In order to be helpful to those who may reinvestigate the strains it appears advantageous to present the data and experiments in chronological sequence with the specimens as they have been received.

*Cultures 1 and 2.*—In response to a request for a culture of *Cl. paratubulinum bovis* the Laboratory at Onderstepoort mailed on June 22, 1927 (ref. 12153) two sealed glass tubes. They were received at San Francisco on August 8, 1927, and were treated as follows: After being immersed in warm 4% formaldehyde for 15 minutes and washed in alcohol, the capillary tips were broken in a flame, and the yellowish slightly turbid content discharged into sterile test-tubes. Each tube contained approximately 1.5 cc. of culture fluid which had an odor of rancid butter. Immediately shake cultures in liver agar and enrichment cultures in beef heart, egg, and glucose veal broth were prepared. The remaining 2 cc. of the culture broth as obtained from South Africa were tested for toxicity by subcutaneous injection into mice. A toxin-antitoxin neutralization test was also made and within 48 hours the mice inoculated with the broth alone and those treated with type B and C antitoxin had succumbed with typical symptoms of botulism. The animal treated with type A antiserum survived. In the meantime the cultures had grown and appeared to be pure. Six colonies were, however, picked and repeatedly purified in shake and plate cultures. They were studied in several series of tests and found to be identical.

*Morphology:* Microscopic examination of the cultures showed gram-positive rods varying in size depending on the medium in which they were grown. Some cells showed spores in the subterminal position and the rods were slightly swollen. Free spores were rare. The median position of the spores was infrequent. In a hanging drop preparation the organisms were slightly motile, but in a capillary tube they exhibited active motility. Three to four stumpy flagella have been demonstrated in Zettnow's preparations.

*Cultural Characteristics.*—Colony Formation: In liver agar small discs with very heavy polar fluffs, which enveloped the dense center were regularly formed. These fluffy colonies with a compact nucleus resembled those of the Cl. paratubulinum groups as described by Bengtson. On the surface of glucose-blood agar plates, cultivated under anaerobic conditions either according to the method of Fortner<sup>4</sup> or to that of Böez,<sup>5</sup> the organism formed small glistening, round, opaque, nonhemolytic colonies resembling the colony type 2 of Schoenholz.<sup>6</sup>

Action on Protein Mediums: In beef heart slow but definite sarcolysis occurred, although little discoloration and no offensive odors were produced. Gelatin was liquefied and coagulated eggwhite in ordinary beef infusion broth was slowly dissolved, becoming complete after about 15 days; the growth was good and a moderate precipitate and a few bubbles of gas were formed. Growth in Hibler's brain medium was poor, no changes in color were noted; the odor was rancid but not putrefactive. In milk the acid precipitated the casein; within 15 to 20 days the curd was slowly digested. The average Sørensen titration figures<sup>7</sup> for six pure subcultures in Difco peptone solution, for the amount of N/NaOH required to neutralize 100 cc. of medium, were as follows: 1st day, 6.5 cc.; 7th day, 13.6 cc.; 14th day, 19.5 cc.

Action on Carbohydrates and Related Substances: In Liebig's extract—Difco peptone solution the organism fermented glucose, levulose, galactose, maltose, glycerol, inositol and dextrin. These reactions were identical with those obtained with five strains of Cl. botulinum type C in this laboratory. The fermentation of inositol was irregular and frequently this alcohol was not utilized.

*Toxin and Immuno-Toxicologic Relations:* A potent toxin was produced in beef heart, liver broth, brain medium and peptone solution. It proved highly active for mice, guinea-pigs, rabbits, dogs and chickens. Invariably it was neutralized by a type A antiserum produced with American strains of the same type.

*Serologic Relations:* The strain was slowly and poorly agglutinated by a homologous serum. In order to secure definite clumping the serum-antigen mixtures had to be held at 56 C. for 2 hours and then for 12 hours at 37 C. The preparation of a potent antiserum was difficult and in several trials a serum with a titer of only 1:3200 was obtained. It failed to agglutinate the type strains 1 to 7 (Schoenholz and Meyer's classification) nor was the organism clumped by the specific type serums. It was serologically an ultraspecific strain.

Since the first shipment revealed a definitely ovolytic Cl. paratubulinum type A which resembled the American strains more closely than that of Cl. paratubulinum bovis, described by Theiler and Robinson, a request for another culture was made.

*Cultures 3 and 4.*—Two glass tubes marked Cl. paratubulinum bovis were mailed on October 19, 1927 (ref. 12155) and were received on December 9, 1927. The material was treated like cultures 1 and 2 and was found to be nontoxic and contaminated with diphtheroid organisms.

4. Centralbl. f. Bakteriöl., 1, O., I Abt., 1929, 110, p. 233.

5. J. Bact., 1927, 13, p. 227.

6. J. Infect. Dis., 1928, 42, p. 40.

7. Paper XXXVIII of this series.



In the original broth of these tubes, aside from the small gram-positive bacilli, numerous spores and shadow forms of a large rod were noted.

*Morphology:* In every culture gram-positive readily sporulating rods with a tendency to chain formation were noted. The spore-bearing rods resembled those of the American type A and B strains since the spores were wider than the vegetative cells and were either in a median or subterminal position. Free spores were abundant. The vegetative forms had lost their gram-positive reaction in 24 to 48 hour cultures and as a rule appeared as faint shadow forms.

*Cultural Characteristics.*—*Colony Formation:* The colonies which developed in liver or veal infusion agar were indistinguishable from those in cultures 1 and 2. As a rule when such colonies were transplanted to beef heart, glucose veal or casein digest media they failed to grow. However, when inoculated into liver broth containing a piece of liver they grew well, produced a considerable amount of gas, and liquefied and blackened the liver tissue. These reactions were noted only when the broth was stratified with vaseline.

*Action on Protein Mediums:* In meat mash medium proteolysis and discoloration were striking and a foul odor emanated from the medium. Coagulated egg-white was rapidly liquefied; in milk the casein was precipitated and dissolved. The average Sørensen's titration figures for the amount of N/NaOH required to neutralize 100 cc. of medium (Difco-peptone solution), were as follows: 1st day, 6.0 cc.; 7th day, 15.0 cc.; 14th day, 20.5 cc.

*Action on Carbohydrates and Related Substances:* The cultures fermented glucose, levulose, maltose, glycerin and salicin.

*Toxin and Immuno-Toxicologic Relations.*—Many of the colonies picked from the primary shake culture although biochemically identical were nontoxic. However, the toxic subcultures formed in every medium a potent type A poison which was fatal to mice, guinea-pigs, rabbits, dogs, pigeons and chickens.

*Serologic Relationship.*—The strain was agglutinated neither by the specific type serums nor by the serums produced with cultures 1 and 2.

An examination of the second tube of the Cl. parobotulinum bovis culture gave identical results after the strain had been purified and thus the possibility of a contamination in the laboratory was conclusively eliminated. The organism here described was present in the glass tubes when they were received. With considerable hesitancy the findings were communicated to South Africa and a request made for a third shipment of cultures.

*Cultures 5 and 6.*—On February 22, 1928, E. M. Robinson forwarded two pipets of Cl. parobotulinum bovis and 50 cc. of Cl. parobotulinum bovis antitoxin. This very interesting material was received on May 11, 1928, and studied according to the procedures outlined under cultures 1 and 2. The culture fluid of the "bovis" pipets was toxic for mice; the poison was neutralized only by the bovis antitoxin and not by either type A, B or C antisera. In smears and in shake cultures the bovis material contained a botulinum-like bacillus which was made the subject

of a detailed study. After repeated purification the following observations were recorded:

*Morphology.*—The organism, for the sake of brevity here described as the “bovis” bacillus, was a rod-shaped unusually pleomorphic anaerobic bacterium (plate figs. 1 and 2). It varied in size from 2 to  $9\mu$  in length and 0.5 to  $0.8\mu$  in width. Aggregations of pairs and chains or long filaments were frequently found in beef heart mash. Large and thick rods were sometimes intermingled with curved or bent forms. They stained irregularly by the Gram method and appeared decidedly barred and granular (fig. 1). In 48-hour cultures gram negative elements and shadow forms prevailed. Certain mediums such as peptone and veal infusion broth induced the development of bizarre fusiform, club-shaped senescent forms.

In Rettger's egg meat medium, large oval spores which slightly distended the rods appeared in terminal or subterminal position in fairly large numbers (fig. 2). Sporulation may be overlooked since free spores sometimes appear early and rapidly germinate again in suitable mediums.

*Motility:* Since the bacillus is very sensitive to oxygen the young rods were always nonmotile in the customary hanging drop preparations. When cultivated and examined in sealed capillary tubes the motility of the young rods was definite. Even the most careful handling of the culture material tears the flagella from the rods and thus far only organisms with one or two long slender flagellar elements and detached giant whips (figs. 3 and 4) have been demonstrated in the Zettnow preparations.

*Cultural Characteristics.*—Colony Formation: In liver agar, when heavily inoculated, relatively few but large and fluffy colonies with a dense center were formed. Growth took place 2 to 3 cm. below the surface. In many ways these colonies resembled those of Cl. botulinum type C (fig. 18, plate 2 in article Botulismus<sup>8</sup>). Some of the colonies selected from the primary shake culture were nontoxic although otherwise indistinguishable from the toxic types.

Occasionally round, slightly granular, lobulated, faintly grayish, glistening, nonhemolytic colonies developed on glucose rabbit blood agar plates held under anaerobic conditions (fig. 6). Cultivation according to the method of Fortner<sup>4</sup> was not successful. Moreover, the colony type observed differed from that illustrated by this writer.

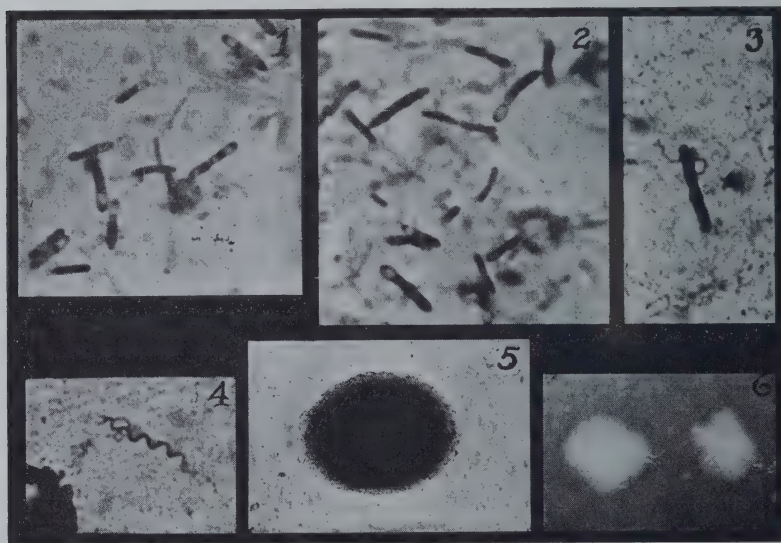
Liver or egg meat gelatin very heavily seeded and covered with vaseline revealed on prolonged incubation small globuloid, slightly granular colonies with very short filamentous projections resembling an irregularly wound coil of cotton threads (fig. 5). Occasionally the globoid colonies are surrounded by large wavy projections similar in arrangement to those noted in deep agar. The center of the colonies exhibited no tendency to liquefaction.

Action on Protein Mediums: In beef heart peptic digest broth the growth was always good and accompanied by the production of a moderate amount of gas. The broth remained clear since the bacterial masses rapidly sedimented onto the meat which was reddened but not softened. The odor of the culture was not offensive but resembled that of butyric acid. Milk stratified with vaseline remained unchanged. Gelatin added to Rettger's egg meat medium or to peptic digest broth and incubated at 37 C. was liquefied within 4 days. The coagulated

egg cube in liver broth was cleared but not dissolved. Growth in Difco-peptone broth was slow and the following Sørensen's titration figures (amount of N/NaOH required to neutralize 100 cc. of medium) have been determined: 1st-3rd day, 0.5 cc.; 7th day, 1.0 cc.; 14th day, 4.0 cc. Indol was not produced.

**Action on Carbohydrates and Allied Substances:** In a medium composed of 0.3% Liebig's extract, 0.5% Difco peptone and 1% carbohydrate, glucose, levulose, sucrose, lactose, maltose, glycerol, inositol and galactose were fermented. No gas was liberated, but the  $P_H$  after 4 days incubation was often as low as 4.6.

Cultures in fluid mediums usually tended to clear rapidly with the formation of a white sediment at the bottom of the tubes. The growth was indicated by slight gas production. In veal broth and peptone solutions the cultures remained turbid and a microscopic examination indicated that the growth consisted of



The morphology and colony types of South African strains of *Clostridium botulinum* type D (Theiler and Robinson).

Figs. 1 and 2.—Sporulating and vegetative forms of *Clostridium botulinum* type D  $\times 1300$ , in beef heart mash.

Fig. 3.—Single flagellum,  $\times 1300$ .

Fig. 4.—Giant whip in agar culture, 18 hours,  $\times 7300$ .

Fig. 5.—Deep colony in egg broth gelatin, no liquefaction,  $\times 30$ .

Fig. 6.—Surface colony on blood agar plate in reflected light,  $\times 6$ .

unusually bizarre meshes of filaments and threads. From cultures in fluid mediums, toxic as well as nontoxic variants were isolated in agar shake tubes.

The bovis bacillus behaved like a strict anaerobe with a low oxygen tolerance. In order to secure growth the mediums, even beef heart mash, required stratification with vaseline. Although growth was noted at 20 C. and 30 C., the optimum temperature for uniform development was at 37 C.

**Toxin and Immuno-Toxicologic Relations.**—The original culture obtained from South Africa was toxic. A powerful poison having an MLD of 1:20,000

for the guinea-pig was readily obtained in beef heart mash. Potent toxin was also generated in Hibler's brain mash after incubation for 3 to 5 days at 37 C., although Theiler and Robinson had stated that toxin was not formed in this medium.

Protection tests were made on guinea-pigs. Ten MLD were mixed with 1, 10, or 100 antitoxic units of type A, B and C and the bovis antiserum prepared by Theiler and his associates in South Africa. One of these experiments is summarized in table 1.

Repeated experiments proved conclusively that only the homologous bovis antiserum afforded protection against and neutralized the bovis toxin. These findings justified the creation of a new type of organism producing botulism in animals, and it was accordingly designated as type D.

*Serologic Relationship:* No agglutination was obtained with the specific and ultraspecific type serums prepared with the representatives of the type A, B and C groups. However, the bovis strain is not inagglutinable and reacts readily with its homologous antiserum.

TABLE 1.—RESULTS OF PROTECTION TESTS

Guinea-Pig Number	Type of Toxin Dose = 10 MLD	Type of Antitoxin Dose = Approx- imately 1 Unit	Result
1.....	Bovis	—	Dead in 24 hours
2.....	Bovis	A	Dead in 24-48 hours
3.....	Bovis	B	Dead in 24-48 hours
4.....	Bovis	C	Dead in 24-48 hours
5.....	Bovis	Bovis	Survived, no symptoms
6.....	A	Bovis	Dead in 24 hours
7.....	B	Bovis	Dead in 24 hours
8.....	C	Bovis	Dead in 24 hours
9.....	A	—	Dead in 24 hours
10.....	A	A	Survived, no symptoms
11.....	B	—	Dead in 24 hours
12.....	B	B	Survived, no symptoms
13.....	C	—	Dead in 24 hours
14.....	C	C	Survived, no symptoms

*Susceptibility of Various Animals to the Toxin:* Since it is a well known fact that the different types of botulinum toxin exert a quantitatively and frequently also a qualitatively different effect upon various animal species, tests were conducted on a quantitative basis in order to determine the comparative susceptibility of laboratory animals. The results are summarized in table 2.

In general the results confirmed the observations of Theiler and his associates, although the susceptibility of the mouse deserves particular recognition. However, it is interesting to note that the fatal feeding dose in all the tests was at least 200 to 3000 times the fatal dose by inoculation. This relationship, which is only approached by the type C strain, will be discussed in a separate paper of this series. One would naturally like to compare the susceptibility of the small herbivorous animals with that of cattle. Actual tests with the pure toxin have not been made and the published data are not comparable since in many of the tests either the raw lamsiekte toxin was used or the fatal dose was not expressed in MLD for the guinea-pig.

The symptoms and anatomic changes of the poisoned animals were identical with those regularly observed following the enteral or parenteral administration of type A, B and C toxins.

*Spore Resistance:* The heat resistance of the spores was tested, using the technic employed by Esty and Meyer.<sup>9</sup> The spores were produced in peptic digest

9. J. Infect. Dis., 1922, 31, p. 650.



gelatin medium incubated at 37 C. for 6 days. A suspension containing approximately 4 million spores per cc. was prepared in phosphate solution. The spores survived boiling for 100 minutes but were destroyed after 120 minutes.

*Cultures 7 and 8.*—On two occasions (December 9, 1927, and May 11, 1928), pipets were received which were marked *Cl. paratubulinum equi*. In both instances the culture fluid in the tubes was nontoxic for mice and guinea-pigs and in subcultures gave rise to nontoxic anaerobic bacteria. The specimens were also contaminated with a diphtheroid. After repeated purifications the second culture (received on May 11,

TABLE 2.—SUSCEPTIBILITY OF VARIOUS ANIMALS TO *CL. BOTULINUM* TYPE D TOXIN

Animal	MLD for Guinea-Pig*	Method of Administration	Results
Guinea-pig 350 gm. ....	1	Subcutaneous	Died in 96 hours
Guinea-pig 350 gm. ....	500	By mouth	Survived, symptoms
Guinea-pig 350 gm. ....	1,000	By mouth	Died in 72 hours
Mouse.....	1/5	Subcutaneous	Survived, symptoms
Mouse.....	1/2	Subcutaneous	Died in 48 hours
Mouse.....	50	By mouth	Survived, symptoms
Mouse.....	100	By mouth	Died in 48 to 72 hours
Rabbit.....	5	Subcutaneous	Died in 96 hours
Rabbit.....	20	Subcutaneous	Died in 18 hours
Rabbit.....	10,000	By mouth	Died in 8 days
Rabbit.....	15,000	By mouth	Died in 90 hours
Chicken.....	1,000	Subcutaneous	Survived, no symptoms
Chicken.....	10,000	Subcutaneous	Survived, no symptoms
Chicken.....	100,000	Subcutaneous	Survived, no symptoms
Pigeon.....	100	Subcutaneous	Survived, no symptoms
Pigeon.....	1,000	Subcutaneous	Survived, no symptoms
Pigeon.....	100,000	Subcutaneous	Died in 24 hours
Rat.....	100	Subcutaneous	Survived, no symptoms
Rat.....	1,000	Subcutaneous	Died in 7 days
Dog.....	10,000	Subcutaneous	Survived, no symptoms
Monkey.....	10,000	Subcutaneous	Died in 27 hours
Monkey.....	40,000	Subcutaneous	Died in 23 hours
Monkey.....	40,000	By mouth	Survived, no symptoms
Monkey.....	200,000	By mouth	Survived, no symptoms

\* MLD = amount necessary to kill a 350 gram guinea-pig in 96 hours on subcutaneous injection.

1928), although nontoxic, was selected for an incomplete study and the following findings were recorded:

Large, plump gram-positive rods frequently in pairs were observed in beef heart mash; spores were not found. In this medium the organisms produced a considerable amount of gas, sedimentation of bacterial debris, but no blackening nor softening of the meat particles. Growth was good in Hibler's brain mash. In veal broth gas was produced and the bacterial growth was rapidly precipitated to the bottom of the tube forming a white flocculent sediment. Similar sedimentation was noted in beef broth containing coagulated egg white, but although the growth was heavy the egg was not attacked. Milk was acidified but without gas formation. In peptone solution the following Sørensen's titration figures, for the amount of N/NaOH required to neutralize 100 cc. of

medium, have been determined: 1st day, 2.00 cc.; 3rd day, 4.50 cc.; 14th day, 6.50 cc.

The colonies in liver agar were small and fluffy. A heavy inoculum was required to obtain a few colonies. In the standard medium the anaerobe fermented, with the production of acid and the liberation of little or no gas, glucose, levulose, glycerol, maltose and dextrin. The bacterium behaved like a nontoxic *Cl. botulinum* and fulfills the cultural and biochemical criteria described by Theiler and Robinson. These workers have shown that the toxin of the equi bacillus is not neutralized by type A, B, C and bovis antisera. Although closely related to the type D it appears to be another new type which has been found in South Africa.

#### DISCUSSION

One naturally hesitates to comment on the results of an incomplete and sketchy study of a few cultures. However, it must be evident to anyone familiar with the botulism problem that the isolation by Robinson of several probably new types of botulinum-like organisms reveals a fascinating chapter in the bacteriology of anaerobic bacteria. Fully cognizant of the many technical difficulties which had to be overcome one must primarily admire the tedious but ultimately successful purification of these organisms. The identification of one of these cultures as a new type, for which the designation type D is proposed, suggests that a variety of proteolytic and nonproteolytic anaerobes is capable of generating a toxin which in its pharmacologic action cannot be distinguished from the original Van Ermengem poison. Morphologically the type D resembles the representatives of the type C group although the rods are considerably more pleomorphic. Furthermore, the motility is sluggish and but few flagella are present. Judged by its nitrogen metabolism the type D is slightly more peptolytic than the type C and the nonovolytic type B strains. The anaerogenic fermentation of glucose, levulose, maltose, glycerol, galactose, sucrose, lactose and inositol with a final  $P_H$  as low as 4.6 places the bacillus in a unique position. Since the anaerobe is gelatinolytic, but not sarcolytic or ovolytic it must be classed with the genus *Clostridium botulinum* as defined by Bengtson.<sup>10</sup> The immunotoxicologic reactions separate it definitely from the well known types A, B and C.

The discovery of a new type which, like the *B. parobotulinus* of Seddon and the type C strains of Bengtson, has been associated with

10. Hyg. Lab. Bull. 136, 1924, p. 30.

animal botulism suggests that in the future many more types may be recognized. In anticipation of this possibility it is important that studies be undertaken to explain the elaboration of different types of toxins which produce the same effects on animals. The immuno-biochemical behavior of the botulinus antigens awaits solution. Then again the relationship of the proteolytic to the nonproteolytic strains, the interrelation of the four types, etc., deserve further investigation. The observation that only the homologous antitoxin neutralizes the type A and type D toxins, but that occasionally type B and C antisera exert heterologous action may possess some significance. The latter types may be more closely related than the former. Cross serologic tests must be used since Pfenninger<sup>11</sup> has shown that the type C group is not uniform. For example the type C antiserum prepared by Seddon for his organism is ultraspecific and never neutralizes the toxin of the American type C strains.

In this connection attention must be called to a statement by Zeissler<sup>12</sup> that a culture of Seddon's bacillus received by him from Australia consisted of a mixture of *Cl. oedematiens* and *Cl. tetani*. He intimates that the toxic properties of the *B. paratetanus* (Seddon) culture must be ascribed to the *Cl. oedematiens* and not to the supposed botulinum-like organism. Observations made in this laboratory by at least four workers lend no support to this contention. The original culture of Seddon received in 1922 elaborates a powerful toxin which promptly paralyzes and fatally poisons laboratory animals when administered by mouth. Subcutaneous injections induce no local reactions such as are customarily seen with the toxin of *Cl. oedematiens*. Furthermore, the careful serological tests of the late Pfenninger and the comparative taxonomic studies by Robinson in South Africa preclude the possibility of the original culture being a mixture of two different anaerobes.

The pathogenicity of the type D strain is exceedingly interesting. According to the published reports relatively small doses of the toxin are fatal to ruminants per os, especially to goats and cattle. In laboratory rodents and in apes just the reverse is the case. The fatal feeding dose is at least 200 to 3,000 times that by inoculation. Many of the experiments of Theiler and his associates were conducted with a raw lamsiekte poison and it is interesting to note that the animals which were rendered ill by feeding a relatively small amount of poison showed the peracute or acute course of the disease. Unfortunately the fatal dose

11. J. Infect. Dis., 1924, 35, p. 347.

12. Handb. d. path. Mikroorganismen, 1928, 4, p. 1117.

is not expressed in guinea-pig MLD and is therefore not comparable with the data here presented. According to table 3 in the article by Theiler and Robinson the guinea-pig is about 10 times as resistant as the cow, sheep and goat. It is therefore quite likely that the susceptibility of cattle is greater for type D toxin than for type A, B or C. This susceptibility of ruminants to the toxin is in strong contrast with the marked immunity of chickens and pigeons; a fact which harmonizes well with the observations made by Theiler and associates that ostriches, turkeys and ducks may ingest large amounts of toxic carrion or cultures without showing any reaction. Spontaneous intoxication in ostriches and ducks has, however, been reported. The type D strain furnishes an example of the well known fact that different types exert a qualitatively different effect on various animals. Susceptibility tests possess a certain amount of diagnostic value and for comparative pur-

TABLE 3.—THE APPROXIMATE SUSCEPTIBILITY OF LABORATORY ANIMALS TO BOTULINUM TOXIN BY SUBCUTANEOUS INJECTION EXPRESSED IN GUINEA-PIG MLD

Toxin Type	MLD for			
	Guinea-Pig	Mouse	Rabbit	Chicken
Type A.....	1	0.15	8 to 10	2,000
Type B proteolytic.....	1	0.12	10	10,000
Type B nonproteolytic....	1	0.2	20	15,000 negative
Type C (strain 526).....	1	0.1	5	25,000
Type D.....	1	0.3 to 0.5	5	100,000 negative

poses it would be valuable if workers in this field of research would agree to express the toxic or fatal dose required to poison a large animal like the horse or cow in guinea-pig or mouse minimum lethal doses per kilograms of body weight. Such a policy would permit a comparative interpretation of the results secured by those who are fortunate enough to be able to test their toxins on large and expensive animals.

The susceptibility of the common laboratory rodents to the four types of botulinum toxin reveals but slight differences when the weight of the animal is considered. On the other hand the poisons may be differentiated by chicken inoculation. This relationship is shown in table 3.

A very important question, which cannot be answered by the studies reported in this paper, is whether or not lamsiekte is always caused by the ingestion of carrion containing the type D toxin. The first culture which was received contained Cl. parobotulinum type A toxin and an anaerobe which differed from the American strains grew in the transplanted cultures. It was less sarcolytic, less putrefactive, and utilized the same carbohydrates as the type C strains. A similar bacillus, although considerably more proteolytic, was found in a second culture



obtained from South Africa. Robinson assured the writers in a personal communication that he has never isolated a type A organism from lamsiekte material. Whether or not he had conducted neutralization tests with all his cultures or with the various raw lamsiekte toxins was not stated. Either the two type A strains found in the cultures are accidental laboratory contaminations which occurred in South Africa or the diseases lamsiekte and equine botulism are caused by several toxicogenic types of the botulinum group, including type A. On account of the high thermal death times of the type A spores, contaminations with these organisms may occur even in well controlled laboratories; and cultures 1 to 4 may have no connection whatever with bovine botulism in South Africa. Carefully conducted neutralization tests with monovalent type A, B, C and D antitoxins with all the raw toxins would be required to decide the monotoxic or polytoxic character of bovine or equine botulism. If it could be proved that only type D and possibly type E strains of *Cl. botulinum* occur in the soil of Africa a very important contribution would have been made to the ecology of these anaerobes. It would be rather surprising if *Cl. paratubulinum* type A, so common in the United States, and also found in Europe, should be absent in South African soil. In this connection it is recalled that until quite recently the *B. paratubulinus* Seddon,<sup>8</sup> a member of type C was the only species of the botulinum group found in Australia. Seddon and Carne<sup>13, 14</sup> now report the demonstration of type B strains in maize—silage and in rabbit carcasses which were suspected in connection with a disease resembling botulism in cattle and horses. Do similar conditions exist in South Africa? This question has yet to be answered.

The senior author has always taken a skeptical attitude toward the evidence, presented in a number of publications, which has attempted to connect the toxin of the botulinum group with forage poisoning in horses and cattle. Until it had been shown that the preformed toxin and not merely the bacillus was present in the suspected food or the tissues of the diseased animals the conclusion that forage poisoning is actually botulism could not be accepted. The work on lamsiekte fulfills all the prerequisites of a carefully controlled set of observations and leaves no doubt that certain forms of forage poisoning of cattle and horses are botulism. However, it is doubtful if in the United States the predisposing factors (allotriophagia of carrion, contamination of hay or horse feed with decomposed rat cadavers, or spoilage of silage) exist

13. Dept. Agri. New South Wales, Veterinary Research Report 2, Sc. Bull. 26, 1926, p. 12.

14. Ibid., Report 3, Sc. Bull. 29, 1927, p. 22.

frequently enough to justify the wholesale diagnosis of animal botulism which is now current practice in certain parts of this country. The South African studies should be consulted by anyone who may suspect equine or bovine botulism and investigators should be guided by the experimental procedures outlined by Theiler and Robinson. Perhaps new types of Cl. botulinum may thus be found and the problem of animal botulism placed on a firmer foundation.

#### CONCLUSIONS

A comparative study of eight cultures of anaerobes secured from South Africa has established the following facts. A nonovolytic, non-sarcolytic organism which elaborates a highly potent neurotoxin was found in two cultures. Pharmacologically this poison acts like the botulinum toxin on small laboratory animals and monkeys. It is not neutralized by any of the known type A, B and C antitoxins. For this bacillus the designation Cl. botulinum type D (Theiler and Robinson) is proposed. Two cultures although nontoxic contained anaerobic bacteria which corresponded morphologically, culturally and biochemically with the descriptions given by Theiler and Robinson for their Cl. parobotulinum equi. One culture when received contained a type A toxin. From this culture a moderately proteolytic Cl. parobotulinum type A which differs from the American and European strains of this species has been isolated. From a second culture an anaerobe with similar properties was demonstrated. The significance of these observations is discussed.









Reprinted from  
THE JOURNAL OF INFECTIOUS DISEASES, Vol. 45, No. 2, August, 1929, pp. 119-134

## CULTURAL STUDY OF AN INTERNATIONAL COLLECTION OF CLOSTRIDIUM BOTULINUM AND PARABOTULINUM. XXXVIII

J. B. GUNNISON AND K. F. MEYER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco*

It is the object of this paper to present for future reference and as an aid to laboratory workers a series of differential criteria which has been disclosed in the course of a cultural and immuno-toxicological study of a collection of organisms concerned in human and animal botulism. On the basis of cultural behavior the anaerobes may be arranged in two groups, *Clostridium botulinum* and *Clostridium parabotulinum* as specified by Bengtson in 1924.<sup>1</sup> Immunological studies indicate at least four and possibly five types on the basis of the kind of toxin produced, while the agglutination tests subdivide these broad and practical classifications into numerous subgroups. Since in the course of artificial cultivation the toxin-producing property of a strain concerned in botulism may be lost in anaerobes morphologically, culturally, and serologically identical with *Cl. botulinum* or *Cl. parabotulinum*, a classification which is based on the physiological behavior of the organisms possesses many advantages. Ever since v. Hibler subdivided the pathogenic and nonpathogenic anaerobes into proteolytic and nonproteolytic species, differential mediums have been selected which demonstrate quickly and decisively the effect of the bacterial proteases on muscle, egg or milk protein. For comparative studies it is, however, imperative that the proteolytic effect be estimated quantitatively. Complete tests of metabolism are unnecessary but the titration of the amino-acids and ammonia production in peptone solutions furnishes valuable information. Furthermore the acid and gas production in mediums containing different carbohydrates may supply important differential criteria. However, the final identification of a botulinum-like rod should never be attempted without toxin-antitoxin neutralization and agglutination tests with group specific antisera. Various other methods of identification have been suggested. For example, the study

Received for publication, April 23, 1929.

1. For references see Meyer: Botulismus, Handb. d. path. Mikroorganismen, 1928, 4, p. 1349.

of surface colonies on glucose blood agar plates. Unfortunately the colony form is not characteristic for any particular type, species, group, or subgroup of the botulinum organisms (see Schoenholz).

The data to be reported have been collected over a period of several years. Retesting has been done frequently and the biochemical properties have been found to be quite stable. No attempt has been made to employ complicated chemical methods, but to select procedures which could be readily repeated and thus permit the rapid identification of a large number of strains.

A total of 53 cultures has been studied. Forty-one were isolated in the United States, 8 originated in Europe, 3 in South Africa, and 1 in Australia. Eighteen of the American strains were type A, 18 were type B, and 5 were type C. Of the European strains 5 were type A and 3 type B; of the South African strains 2 were type A and 1 type D. The Australian culture belonged to a subgroup of type C since the toxin was neutralized by an antitoxin prepared from type C strains, but the homologous antitoxin failed to prevent the action of the type C poison (Pfenninger<sup>2</sup>).

The American strains of types A and B were representative of the 7 serologic groups determined by Schoenholz and Meyer.<sup>3</sup> They had been isolated throughout the United States from various sources including animal and human outbreaks of botulism, soil, plants and food products. Some of the cultures were isolated in this laboratory, while some were obtained from other institutions. Five nontoxic strains which were identified as *Cl. paratubulinum* by serologic means were included. One strain (161) isolated in this laboratory from a sample of soil from Switzerland has been classed with the European strains.

The American type C strains had been previously studied by Bengtson<sup>4</sup> who gave their origin in detail. They were isolated from fly larvae by Bengtson and from chickens and horses which had died of botulism by Graham. The Australian type C was isolated by Seddon from botulism in cattle and was designated by him as *B. paratubulinus*.

The South African cultures, which have been described in detail in paper 37<sup>5</sup> of this series, were isolated by Robinson and were involved in bovine botulism.

2. J. Infect. Dis., 1924, 35, p. 347.

3. J. Immunol., 1925, 10, p. 1.

4. Hyg. Lab. Bull. 136, 1924, p. 5.

5. J. Infect. Dis., 1929, 45, p. 106.

The origin of the European cultures has been given in paper 36<sup>6</sup> of this series and need not be repeated here. The 5 type A strains could be placed in the serologic groups (2 in group 1 and 3 in group 2) with the American strains, but the 3 type B cultures were ultraspecific.

Four of the Cl. sporogenes cultures were of American origin, while the fifth was isolated from a culture labelled *B. botulinus* Van Ermen-gem obtained from Europe.

The results of the tests with individual American strains are not given except in cases of marked variation, but are reported according to the serologic groups. The reactions of the strains from other countries, however, are given in detail.

#### ACTION ON PROTEIN MEDIUMS

In order to determine whether or not the strains differed in their proteolytic activity, cultural tests were first made. The mediums employed were peptic digest beef heart broth, coagulated eggwhite medium, egg-meat mixture, brom cresol purple milk, and gelatin.

The action of the American type A and B strains was fairly uniform, with a single exception (strain 38 type A group 1). In beef heart broth growth was profuse and rapid with marked turbidity, gas formation, and evidence of proteolytic activity after 24 to 48 hours. The meat particles became darkened and softened and after 5 to 10 days there was digestion resulting in reduction of the volume of the meat. A decidedly unpleasant putrefactive odor was produced. In the coagulated eggwhite medium, there was turbidity and a small amount of gas. Digestion of the cube of eggwhite set in on the second or third day and was complete after 7 to 14 days. The edges of the cubes became rounded, and they gradually became more transparent and reduced in size until nothing remained but a slight precipitate. The egg-meat medium was first reddened, then blackened, and markedly digested after 5 to 7 days with the production of a foul odor. Milk cultures showed acidity and coagulation of the casein in 1 to 3 days, and liquefaction of the curd in 3 to 5 days. After 5 to 7 days gas was produced and the digestion of the casein progressed rapidly until only a flocculent mass in a clear light brown fluid remained. Gelatin was liquefied in 3 to 5 days.

The American type A and B strains were therefore definitely proteolytic since they attacked native proteins. The type B strains,

6. Ibid., p. 96.



especially those of group 4, produced somewhat more rapid and marked changes than the type A organisms. The one exception, strain 38 type A group 1, was somewhat less active than the rest. It showed very slight blackening and digestion of meat and only partial (25%) liquefaction of eggwhite after prolonged incubation.

The type C strains from America produced no reactions indicative of proteolytic activity other than the liquefaction of gelatin after 10 to 12 days. They grew well in the mediums used and produced a slight amount of gas, but the initial turbidity soon cleared up. The odor of the cultures was faintly butyric. They produced a trace of acid in milk, which was usually insufficient to coagulate the casein. The Australian type C strain gave reactions identical with those of the American cultures of this type.

The European cultures of type A and one of the type B cultures (169) behaved in the same manner as the American strains of this type; that is, they were markedly proteolytic. Two of the type B strains from Europe, on the other hand, gave reactions identical with those of the type C organisms. One of them (162) produced unusually large amounts of gas from all mediums.

The two type A cultures from South Africa were both proteolytic. The type D strain resembled the type C and European type B cultures in its failure to attack proteins, other than the derived protein gelatin.

The *Cl. sporogenes* cultures were markedly proteolytic and behaved like the American strains of *Cl. parabotulinum*.

To summarize, all the type A cultures studied from any source, the American type B strains, and one European type B culture were actively proteolytic. Two European type B strains, the type C strains, and the type D strain were nonproteolytic. As Reddish and Rettger<sup>7</sup> and Bengtson<sup>4</sup> have advised, the term proteolytic should be used as a general term to signify the digestion of native proteins. The former writers have stated that gelatin liquefaction should not be considered an index of proteolysis but simply as digestion of a derived protein to which the term gelatinolysis should be applied. Miller and Reddish<sup>8</sup> have advocated that specific terms be used to designate the digestion of each kind of protein. Thus the organisms which have been described as proteolytic are gelatinolytic, sarcolytic, casseinolytic and ovolytic; while the non-proteolytic strains are merely gelatinolytic. It is interesting to note that nonproteolytic strains required more rigid condi-

7. J. Bact., 1924, 9, p. 13.

8. Science, 1923, 57, p. 23.

tions of anaerobiosis than proteolytic ones. As a rule, cultures of the former group must be stratified with vaseline to ensure growth.

*Peptolytic Properties.*—Since the qualitative cultural tests showed definite differences of varying degree in the proteolytic action of the strains, it was thought advisable to study their nitrogen metabolism quantitatively. Due to the difficulty in standardizing meat mediums it was necessary to use peptone broth. It must be remembered, however, that the splitting of peptone is merely a measure of peptolytic, not of proteolytic, activity.

The procedure first used was a modification of that of Reddish and Rettger<sup>7</sup> in their studies of anaerobes. As the growth of certain strains, especially the non-proteolytic ones, was inconstant in the 1% peptone broth they employed, a richer medium was used. The broth was made as they described, taking care to prevent loss of phosphate material by precipitation, and contained 4% Difco peptone, 1% Liebig's extract, and 0.5% sodium chloride. It was adjusted to  $P_H$  7.4, placed in bottles in 50 cc. amounts and sealed with vaseline.

The methods used in the preliminary experiments to determine the nitrogen changes in this medium were Brown's modification of the formol titration according to Sørensen,<sup>9</sup> the amino-acid determination of Van Slyke, and the Folin aeration method of ammonia determination. One-tenth cc. amounts of 24-hour beef heart cultures of the strains to be tested were inoculated into a series of bottles of the peptone medium, a separate bottle being planted for each day's determinations.

Seven strains, 3 type A, 3 type B and 1 type C, were tested. The type A and B strains were markedly peptolytic, and the type B cultures were somewhat more active than those of type A. The accumulation of ammonia nitrogen was rapid; while the increase in amino nitrogen was more gradual, sometimes following an initial lag. The type C strain possessed only slight powers of peptolysis. In this culture there was but little increase in ammonia nitrogen, but the rise in amino nitrogen was approximately the same as with the more peptolytic strains. This would indicate that this strain could break down peptone to amino-acids, but was incapable of producing marked deamination.

These statements are illustrated by the following data. The type A strains produced, after 9 days incubation at 37 C., 145 mg. to 221 mg. of ammonia nitrogen and 13 mg. to 68 mg. of amino nitrogen per 100 cc. of medium. The type B strains yielded 176 mg. to 264 mg. of ammonia nitrogen and 22 mg. to 69 mg. of amino nitrogen per 100 cc. of medium. On the other hand, the type C strain, after 14 days incubation, produced only 7 mg. of ammonia nitrogen but 39 mg. of amino nitrogen per 100 cc.

9. J. Bact., 1923, 8, p. 245.

Since such tests are time-consuming and involve many possible sources of error, it was not considered practicable to attempt to carry them through with a large group of strains. Therefore, a simpler method was sought to determine the peptolytic properties of the various strains.

The Sørensen figures, when converted to milligrams of nitrogen per 100 cc., approximately equaled the sum of the ammonia and amino nitrogen as determined by the methods of Folin and Van Slyke, respectively. In some instances the amount of nitrogen determined by the formol titration was exactly equal to the amount obtained by the other methods, while in other series of tests these values differed by as much as 15%. However, the average difference was not greater than 10%. Whether these discrepancies were due to the inaccuracy of the Sørensen titration or to errors in the other methods is not known. The formol titration was found to be the best simple method available for approximating the amount of ammonia nitrogen plus amino nitrogen. As Kendall, Day and Walker<sup>10</sup> have stated, "In general, the precision of the Sørensen method is commensurate with the accuracy attending the parallel development of bacterial growths." Accordingly, all the strains were studied by this method.

Two cc. of the culture, grown in the medium described above, were placed in each of two large tubes and 4 cc. of distilled water were added. One of the tubes served as a color screen in the comparator block, while 0.5 cc. of phenol red was placed in the sample tube. The reaction of the sample was brought up to  $P_H$  8.0 with N/20 NaOH and 1 cc. more indicator was added. Then 10 cc. of formalin, which had been freshly adjusted to  $P_H$  8.0 with N/NaOH, were added to both the color screen and the sample. After twirling the sample gently it was at once titrated with N/20 NaOH to  $P_H$  8.0. All tests were run in duplicate. The titration of the uninoculated medium was always subtracted from the result obtained with the sample. The results were expressed as "Sørensen figures"; i. e., as the number of cc. of normal sodium hydroxide required to neutralize 100 cc. of culture after the addition of formalin. It was thought inadvisable to convert these figures to mg. of nitrogen, because the values obtained were not always true. Tests were made on the first, third, seventh and fourteenth days. The course of peptolysis could easily be followed by this means and the activity of the strains compared (table 2).

These tests showed that all of the type A strains, regardless of origin, were strongly peptolytic. The average Sørensen figures after 14 days incubation were 17.5 to 20, which represented from 245 to 280 mg. of amino and ammonia nitrogen per 100 cc. of culture. Five of the strains, including one (156A) which gave the serologic reactions

10. J. Infect. Dis., 1922, 30, p. 141.

of a type B group 5 organism, had somewhat lower values than the average. One European strain (161) showed slightly higher figures than the majority of the type A strains. There was no appreciable difference in the results obtained with members of the serologic groups of this type; nor was there any distinction between the American, European, and South African cultures.

The American type B strains were, in general, slightly more active than the type A strains. After 14 days incubation, the average Sørensen figures for these strains ranged from 19 to 22; i. e., approximately 266 to 322 mg. of nitrogen per 100 cc. Two type B cultures which were placed in serologic group 1 type A, gave higher Sørensen values than the other members of that group. Serologic groups 4 and 6 contained the most active strains, while groups 5 and 7 were the same as the type A groups. The nontoxic strains of group 4 gave Sørensen figures slightly higher than the average of type B strains, while those of group 5 were appreciably lower.

Two of the European type B strains were weakly peptolytic; the Lister 94B strain yielded 80 mg. of amino and ammonia nitrogen and strain 162B only 28 mg. after 14 days. Strain 162B was the only one which showed an initial decrease in the Sørensen figure. The third European type B strain, on the other hand, behaved like the American cultures.

Four of the American Type C strains were nonpeptolytic, the Sørensen figures being less than one. The fifth strain (3420) and the Australian strain resembled the Lister 94B culture in showing a slight increase in the Sørensen figure. The type D culture was likewise mildly peptolytic.

In brief, the cultures studied could be divided into three groups as regards their peptolytic properties. The first, or strongly peptolytic group, included all of the type A strains, the American type B and one European type B strain. The second, mildly peptolytic group, contained two European type B, one American type C (3420), the Australian type C, and the type D strain. The last group, which showed only a trace of peptone-splitting activity, was composed of four type C cultures of American origin. It was impossible to distinguish the serologic groups by this means.

The Cl. sporogenes cultures gave Sørensen figures about the same as those of the Cl. botulinum type A cultures, but lower than those of the average type B strains.



## ACTION ON CARBOHYDRATES AND RELATED SUBSTANCES

Since there is considerable disagreement in the literature as to the fermentation reactions of *Cl. botulinum* the action on carbohydrates was tested.

The following carbohydrates and related substances were used: dextrose, levulose, galactose, sucrose, lactose, maltose, raffinose, inulin, glycerol, adonitol, dulcitol, mannitol, dextrin, inositol and salicin. The medium employed was standard extract broth containing 0.3% Liebig's beef extract and 0.5% Difco peptone. To this base medium, after sterilization, 1% of the various sugars was added. The medium was tubed aseptically in small tubes in 3 cc. amounts, overlaid with sterile vaseline, and autoclaved for 12 minutes at 15 pounds pressure. The tubes were inoculated with approximately 0.1 cc. of 18-hour beef heart cultures by means of Pasteur pipettes. After incubating for 96 hours at 37.5 C. the amount of growth and gas formation was observed and the  $P_H$  of each tube was determined colorimetrically. The results are presented in table 1.

A definite decrease in the  $P_H$  value was taken as the criterion of fermentation. As controls, the  $P_H$  of the uninoculated but incubated tubes of each test substance was determined, as well as that of the various strains grown in the same base medium without carbohydrate. Slight differences between the  $P_H$  of a given strain in medium without sugar and in carbohydrate broth were considered to be of no significance, while differences of 0.5 or more in the  $P_H$  value indicated that fermentation had taken place.

The majority of the strains caused a decrease from an initial  $P_H$  of 7.4 to 7.0 to a  $P_H$  of 7.0 to 6.5 in broth without carbohydrate and in the presence of those sugars which were not fermented. In the tubes showing fermentation the  $P_H$  ranged from 6.2 to 5.2; and there was usually, but not always, a varying amount of gas production.

In a small series pieces of glass tubing (30 cm. long) sealed at one end were filled with 5 cc. of the carbohydrate broth, stratified with vaseline, inoculated and incubated for 96 hours in order to record graphically the volume of gas liberated.

One strain, the type C from Australia, failed to ferment any carbohydrate tested, although it grew well in the medium employed. All of the other strains fermented glucose, levulose, maltose and glycerol; the most active fermentation occurring in dextrose and maltose. Raffinose, inulin, dulcitol and mannitol were not attacked by any strain.

The American type A and B strains, with a few exceptions, gave uniform reactions, and there was no differentiation between the types nor among the serologic groups. In addition to the sugars named above these strains all ferment dextrin. Salicin was fermented by all but four strains belonging to serologic groups 1, 2, 4 and 7 respectively. One strain, 114 type B group 7, attacked sucrose, producing a marked decrease in  $P_H$ , but no gas. It was interesting to note that the five

TABLE 1.—FERMENTATION REACTIONS OF CL. BOTULINUM, CL. PARABOTULINUM AND CL. SPOROGENES

PH After 4 Days Incubation at 37 C.															
Toxi- cologic Type	Sero- logic Group	Number of Strains Tested*	Origin	Dex- trose	Levi- tose	Mal- tose	Glyc- erol	Dex- trin	Sali- cyl	Galac- tose	Ino- sitol	Ado- nitol	Stu- crose	Lac- tose	Raffinose, Inulin, Dulcitol, Mannitol, No Sugar
A	1	4	United States	5.6++	5.7+	5.4++	6.1+	5.9++	5.8+	6.6	6.8	6.8	6.7	6.9	6.8-7.0
A	1	1 (62)	United States	5.7++	6.2+	5.6++	5.8+	5.6++	6.9	6.5	6.8	6.8	6.8	6.7	6.7-6.9
B	1	2	United States	5.5++	5.9+	5.7++	6.1+	5.6++	5.7+	6.4	6.8	6.6	6.6	6.7	6.6-7.0
A	1	1 (195)	Europe	5.6++	5.5++	5.6++	6.0+	5.8++	5.6+	6.6	6.8	6.7	6.5	6.8	6.5-6.8
A	1	1 (161)	Europe	5.6++	6.0++	5.2++	5.6++	5.8++	6.6	6.5	6.8	6.6	6.9	6.6	6.4-6.8
A	2	5	United States	5.5++	5.7+	5.6++	6.0++	5.7++	6.6	6.5	6.6	6.7	6.9	7.0	6.5-7.1
A	2	1 (137)	Europe	5.6+	6.2+	6.1+	6.2+	5.6++	6.9	6.4	6.8	6.6	6.7	6.7	6.6-6.9
A	2	1 (154)	Europe	5.7++	5.8++	5.5++	5.9++	5.6++	6.7	6.6	6.6	6.7	6.8	6.9	6.6-7.0
A	2	1 (155)	Europe	5.8++	6.0++	5.5++	6.0++	5.9++	6.8	6.6	7.0	6.6	6.7	7.0	6.5-7.0
A	Ultra-	4	United States	5.5++	5.9+	5.4++	6.0++	6.2++	5.7++	6.6	6.7	6.8	6.5	6.8	6.5-7.0
A	specific	1 (163)	South Africa	5.3++	5.8+	5.6++	5.9++	5.6+	6.7	5.6++	5.6+	6.7	6.6	6.8	6.6-7.0
A	specific	1 (164)	South Africa	5.2++	5.4++	5.2++	5.8++	6.6	5.6++	6.5	6.5	6.5	6.6	6.5	6.4-6.6
B	4	1 (6)	United States	5.2++	5.2+	5.2++	5.9+	6.2++	6.0	6.4	6.5	6.5	6.7	6.6	6.6-6.9
B	4	1	United States	5.2++	5.3++	5.4++	5.5+	6.2++	6.6	6.5	6.7	6.6	6.7	6.6	6.6-6.7
Nontoxic	4	2	United States	5.2++	5.3++	5.4++	5.9+	6.2++	6.0+	6.5	6.7	6.6	6.6	6.7	6.5-6.8
B	5	3	United States	5.4++	5.7+	5.5++	5.9+	5.6++	5.8++	6.6	6.8	6.7	6.8	6.9	6.6-7.1
Nontoxic	5	3	United States	5.3++	6.1+	5.2++	5.7++	5.7++	5.6++	6.7	6.7	6.9	6.9	6.7	6.7-7.0
A	5	2	United States	5.6++	5.9+	5.4++	6.2+	5.8++	6.0+	6.6	6.8	6.8	6.7	6.8	6.6-7.0
B	6	3	United States	5.6++	5.8+	5.5++	5.9++	5.8++	5.7+	6.6	6.9	6.6	6.6	6.9	6.5-6.9
B	Ultra-	3	United States	5.4++	5.8+	5.5++	5.9+	5.7++	5.8+	6.5	6.6	6.6	6.5	6.6	6.5-6.9
B	specific	1 (194)	Europe	5.4++	5.4++	5.4++	5.8++	5.5++	6.4	3.8	5.6+	5.4++	6.6	6.8	6.6-6.8
B	specific	1 (162)	Europe	5.2++	5.2++	5.2++	5.2++	5.4++	6.4	6.7	6.4	5.2++	5.2+	6.4	6.3-6.6
B	specific	1 (114)	United States	5.5+	5.6+	5.4+	6.1+	6.1+	6.6	6.4	6.6	6.6	5.5	6.6	6.6-6.7
B	specific	1 (169)	Europe	5.2++	5.4++	5.2++	5.8+	5.4+	6.5	6.8	7.2	7.0	7.2	7.0	7.0-7.4
Cα	specific	5	United States	5.4+	5.7+	5.7+	5.7+	5.7+	6.6	5.8+	5.6+	6.7	6.8	6.9	6.2-7.1
Cβ.	1	1	Australia	7.0	7.0	7.1	7.0	6.6	6.9	6.9	6.7	6.7	6.9	6.8	6.8-7.0
D	1	1	South Africa	5.2	5.4	4.6	5.4	6.4	6.8	5.2	5.2	7.0	4.6	4.6	6.7-7.0
CL sporogenes	4	4	United States	5.5++	5.8+	5.6++	5.7++	5.6++	6.6	6.5	6.5	6.7	6.7	6.8	6.5-7.0
CL sporogenes	1	1	Europe	5.2++	5.2+	5.8+	5.8++	6.6	6.5	6.3	6.5	6.6	6.8	6.7	6.5-6.7
Uninoculated control				7.2	7.0	7.0	7.4	7.0	7.4	6.8	7.0	7.0	7.2	7.1	7.0-7.3

++ indicates abundant amount of gas, + indicates moderate amount of gas.

\* The figures on the left indicate the number of strains tested, while those in parentheses are the serial numbers of certain strains.

TABLE 2.—CLASSIFICATION OF ORGANISMS CONCERNED IN HUMAN AND ANIMAL BOTULISM

Strains Tested		Sørensen Figures										Fermentation Reactions										Remarks
		1 Day†			3 Days			7 Days			14 Days			Dex. Levu- Mal- Glyc- Dex- Sal- Galac- Ino- Ado- Su- Lac-								
Origin	Type Number*	Mini- mum	Maxi- mum	Aver- age	Mini- mum	Maxi- mum	Aver- age	Mini- mum	Maxi- mum	Aver- age	Mini- mum	Maxi- mum	Aver- age	trose	trose	trose	trin	icin	tose	sitol	cro- tose	lactose
United States	A 18	3.00	12.22	5.88	5.50	17.00	11.14	7.00	21.37	14.06	14.50	22.50	18.21	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	—	2 strains failed to ferment salicin
Europe	A 5	4.12	10.12	7.74	9.22	13.50	11.72	13.87	18.00	15.17	17.37	22.50	19.79	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	—	—	1 strain fermented salicin
South Africa	A 1 (163)			6.50						13.60			19.50	⊕	⊕	⊕	⊕	—	⊕	—	—	—
South Africa	A 1 (164)			6.00			11.00			15.00			20.50	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	—	—	—
United States	B 18	4.00	17.12	8.59	8.50	17.87	12.89	12.75	23.50	17.31	14.50	25.02	21.32	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	—	1 strain fermented sucrose
Europe	B 1 (169)			5.75			13.00			16.50			21.50	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	—	—	2 strains failed to ferment salicin
Europe	B 1 (194)			1.37			1.62			1.37			5.75	⊕	⊕	⊕	⊕	—	⊕	—	—	—
Europe	B 1 (162)			—0.25			1.00			1.50			2.00	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	⊕	—	—
United States	Ca 5	0.12	0.62	0.32	0.12	0.62	0.32	0.37	3.12	0.97	0.37	5.62	1.52	⊕	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	—	—
Australia	Cβ 1 (Seddon)			0.62			1.12			1.37			4.62	—	—	—	—	—	—	—	—	—
South Africa	D 1			0.50			0.50			1.00			4.00	+	+	+	+	+	+	—	+	+
United States	Cl. sporogenes 4	7.12	13.00	9.24	12.62	18.50	14.59	13.87	18.00	16.69	17.62	20.50	18.81	⊕	⊕	⊕	⊕	—	—	—	—	—

\* The total number of strains tested, and in parentheses the serial numbers of certain strains.  
† The minimum, the maximum, and the average = the lowest, the highest, and the average Sørensen figure, respectively, given by members of the group.  
+ = acid, ⊕ = acid and gas, and — = no reaction

nontoxic strains (2 of group 4 and 3 of group 5) gave reactions identical with those of the toxic strains.

The European type A strains and the proteolytic type B strain resembled the American strains in fermenting dextrose, levulose, maltose, glycerol and dextrin. One of them (Lister 95 type A) broke down salicin, while the others failed to do so.

The nonproteolytic European type B strains each gave reactions which differed from those of any other culture. The Lister 94B strain produced acid and gas from dextrose, levulose, glycerol, maltose, dextrin, adonitol and inositol. These results were identical with those obtained by Bengtson.<sup>4</sup> Strain 162B fermented all the sugars attacked by the Lister 94 strain except inositol and in addition broke down sucrose. This strain produced unusually large amounts of gas and marked decrease in  $P_H$  in those carbohydrates which it fermented.

The type C cultures differed from other American strains in their ability to ferment galactose and inositol. In addition they acted upon glucose, levulose, maltose, glycerol and dextrin, but failed to ferment salicin. These results agreed with those of Bengtson with the exception that she reported that dextrin was not attacked by type C organisms.

One South African type A strain (163) gave fermentation reactions identical with those of the type C cultures. The other (164) showed the same reactions as the American type A strains except that it failed to ferment dextrin. This was the only type A strain tested which did not break down this substance.

The type D culture from South Africa differed from the other strains in that it produced no gas in any of the test substances. The  $P_H$  was reduced to 4.6 to 5.0 after 4 days growth in broth containing glucose, levulose, sucrose, lactose, maltose, glycerol, inositol and galactose. This was the only culture which attacked lactose.

The *Cl. sporogenes* cultures fermented only glucose, levulose, maltose and glycerol. The failure of 8 strains of type A (4 European and 4 American) to attack salicin is of interest because the fermentation of this sugar has been used by Hall<sup>11</sup> to differentiate *Cl. paratubulinum* from *Cl. sporogenes*. The five nontoxic strains of *Cl. paratubulinum* all attacked salicin.

#### DISCUSSION

In classification studies of anaerobes the property of breaking down protein media is of greater significance than the ability to ferment

11. J. Infect. Dis., 1922, 30, p. 473.



carbohydrates. This is particularly true when one deals with organisms which decompose native protein in variable degrees. The strains of organisms concerned in human and animal botulism in different parts of the world may be roughly classified by their action on cubes of eggwhite. Those strains which digest the coagulated eggwhite have been designated by Bengtson as *Cl. paratubulinum*, while those which are unable to attack the eggwhite are known as representatives of the *Cl. botulinum* group. The writers have fully confirmed and amplified the observations of Bengtson and recommend that the designations ovolytic and nonovolytic and the group designation *Cl. botulinum* and *paratubulinum* be adopted in the nomenclature of anaerobic organisms. In the light of the results which deal with the peptolytic properties of the various cultures one is tempted to subclassify the botulinum species. For example, the highly peptolytic strains with Sørensen's figures of from 18.0 to 21.0 cc. of N/1 NaOH required to neutralize 100 cc. of a 14 day peptone culture would be known as *Cl. paratubulinum* proper. The strains which require 5 to 6 cc. to neutralize a 14-day culture could be designated as *Cl. metatubulinum*. In this group one could place certain European type B, the Australian type C, the South African type D, and certain American type C strains. A group of chemically inactive botulinum organisms with Sørensen figures of less than 2.0 cc. would include certain nonovolytic type B and the majority of the American type C strains and could be recorded as the true *Cl. botulinum*. Since the number of nonovolytic strains incorporated in the present study is small and since transitions between the metatubulinum and botulinum group are indicated by the data thus far collected a subdivision into three species is probably not justified. Future biochemical investigations should, however, consider the possibility of further separation of the organisms concerned in botulism.

In the initial identification the morphology, especially the position of the spores and the arrangement of the rods, may be of some value. In fact, the division into the two groups, *Cl. botulinum* and *Cl. paratubulinum*, is supported by morphological evidence. However, it is important to remember that the microscopic findings remain secondary to the physiologic behavior of the organisms.

Differences in the fermentation of carbohydrate test substances are of doubtful classification value. Based on the fermentation reactions of a dozen carbohydrates and related substances the 53 strains could be classed into at least 8 different groups. If one should take into consideration the single and detailed investigations reported by Van

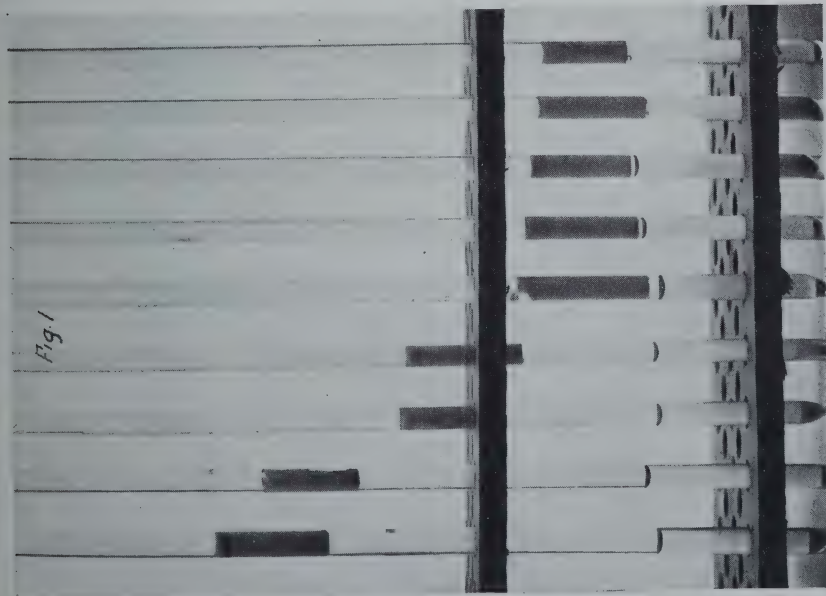


Fig. 1



Fig. 2

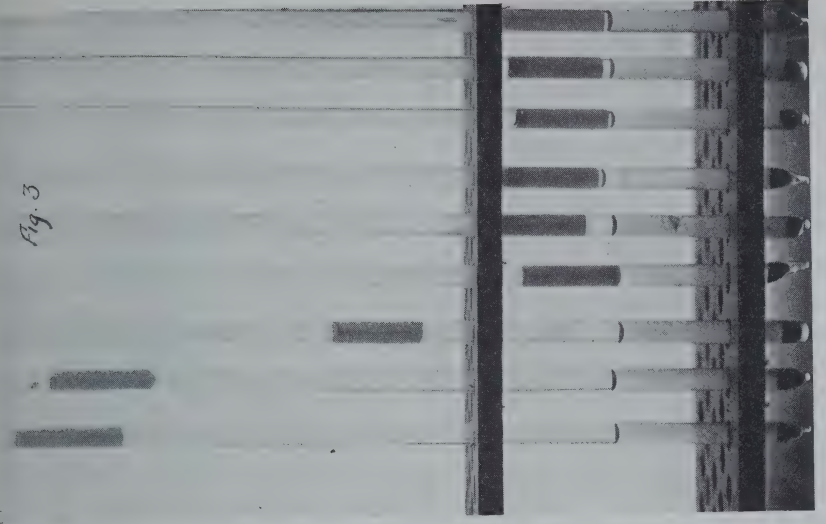


Fig. 3

Gas production from various carbohydrates by *Cl. Parabotulinum* and *Cl. Sporogenes*. Fig. 1: *Cl. parabotulinum* type A. Fig. 2: *Cl. parabotulinum* type B. Fig. 3: *Cl. sporogenes*.  
 Tube 1, dextrose; 2, maltose; 3, levulose; 4, salicin; 5, galactose; 6, sucrose; 7, mannose; 8, lactose; 9, no sugar.

Ermengem; McIntosh and Fildes; Hall; Kendall, Day, and Walker; Kahn; Reddish; Armstrong, Story, and Scott; Nevin; Thom, Edmondson, and Giltner; and Zeissler and Rassfeld<sup>12</sup> the results would be even more diversified. General agreement has only been reached that the typical type A and B strains regularly ferment glucose and its polymeres and maltose, while glycerol, saccharose, lactose and starch may or may not be attacked. Probably impurities of the cultures are only in part responsible for these variations. The composition of the medium is more important since Townsend<sup>13</sup> has shown that the ability of a strain to break down a given carbohydrate substance varies with the protein, peptone and salt content of the basic medium. Hence, it is quite evident that if fermentation tests are employed as an aid in classification of anaerobic organisms, a standard medium of simple composition must be adopted and used consistently in all comparative studies. The final H-ion concentration must be determined with the aid of sensitive indicators and not with litmus solution. These principles have been followed and the same reactions as recorded in table 1 have been secured with different batches of medium and peptones, although the tests have been made 12 to 24 months apart. However, the interpretation of the reactions is not always clear. In the medium employed in the tests the Australian type C strain lacks the ability to use carbohydrates as sources of energy, and the type D strain is nonaerogenic and merely acidifies the broth. These observations are contrary to the findings of Wagner-Sommer<sup>14</sup> who demonstrated the glucose consuming power of the Seddon type C strain in a double strength—veal infusion—peptic digest—1% gelatin medium. The fermentation tests as generally used merely express the results of a differential diagnostic biologic test and not the ability of an organism to utilize the various sugars or related substances in their metabolism. It is therefore unsafe to identify the botulinum-like organisms according to fermentation tests. However, it is now proven that certain strains, especially those of European origin, give reactions which differ markedly from those of the majority of the American strains. Provided no undue emphasis is placed on the results which are apt to be inconstant since strains of the same group may vary in their ability to attack the differential substance, as for example salicin, the fermentation reaction will remain an interesting and possibly convenient test.

12. *Centralbl. f. Bakteriol.*, 1, O., 1929, 110, p. 24.

13. Personal communication.

14. *J. Infect. Dis.*, 1924, 35, p. 353.

The ultimate identification, if not made by pathogenicity and toxico-immunologic tests, is aided by macroscopic agglutination tests. A number of the interesting strains of organisms concerned in botulism are, however, ultraspecific. The two European nonovolytic type B strains are only agglutinated by their respective homologous serums. Equally specific are the two South African type A strains. It is therefore not unlikely that a classification into four or five groups is impossible since an endless variety of serologic nuances may erase the fixed boundaries originally established by a study of American strains (Schoenholz and Gunnison). In combination with the biochemical tests the agglutination reaction is useful and should be constantly employed in the identification of nontoxic strains of *Clostridium botulinum* and *parabotulinum*.

The observation of Pfenninger that the Australian strain Seddon produces a toxin which is neutralized by a type C antitoxin but that the specific Seddon antitoxin is inactive against other representatives of the type C group has been confirmed. It is not unlikely that type divisions made with a mixture of toxins of the same group may be misleading since the various poisons may be composed of several part antigens. No strain should be considered typed without reciprocal cross protection tests. The time consuming immunization of rabbits is facilitated by using toxoid solutions prepared according to the principles laid down by Weinberg and Goy.<sup>15</sup>

The identification and classification of organisms involved in human and animal botulism becomes more difficult and complex as new strains are added to the list of the already known types. So far the isolation of new species and types has been accidental and it is not unlikely that systematic researches into the distribution of the botulinum-like organisms may lead to the discovery of even a greater variety than is represented in the small collection which is the subject of this communication. Four continents have furnished different types, North America the ovolytic types A and B and the nonovolytic type C, Australia a peculiar type C, Europe a nonovolytic type B as well as ovolytic types A and B, and South Africa a nonovolytic type D. Are these the predominant types? What is their distribution and their relationship to disease? What types occur in Asia and South America? An endless list of questions could be cited. Suffice it to emphasize that the ecology of the anaerobes which generate under suitable condition a neuro-paralytic poison is one of the most fascinating problems of modern bacteriology.

15. Compt. rend. Soc. de biol., 1925, 92, p. 564.



## SUMMARY

Cultural, biochemical, and serologic studies conducted with the simplest medium and by the use of the simplest technic with 53 strains concerned in human and animal botulism have shown that the action on native protein, the peptolytic property, the fermentation reactions, the agglutination and the toxin-antitoxin neutralization test are of importance for classification.

On the basis of cultural and peptolytic behavior the anaerobes are arranged in two groups: *Clostridium botulinum* (nonovolytic, Sørensen figures 1 to 6) and *Cl. parabotulinum* (ovolytic, Sørensen figures 18 to 21).

The agglutination tests subdivide the four, possibly five, toxicologic types (A, B, C $\alpha$ , C $\beta$  and D) into at least 15 subgroups while the fermentation reactions place the strains in at least 8 groups.

Strains fundamentally different from those commonly encountered on the North American continent have been isolated in Europe, Australia and Africa.

## BOTULISM DUE TO HOME CANNED BARTLETT PEARS. XXXIX

K. F. MEYER AND J. B. GUNNISON

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco*

Home canned foods, especially those preserved by either the cold pack or the open kettle method, continue to be involved in the botulism cases which have been reported during the past three years. Canned string beans or corn have been the main offenders. Occasionally the monotonous character of these food poisoning cases is changed by the occurrence of an outbreak in which an article of food rarely connected with botulism is the carrier of the deadly toxin; or in very exceptional instances even plant or animal products supposedly immune from botulinum spoilage are definitely linked with fatal cases. Such an instance presented itself in 1927 in the deaths of two people who had tasted slices of spoiled home canned Bartlett pears. Although in two previous outbreaks the ingestion of home preserved pears was connected with the poisoning of at least 13 people, no conclusive evidence was presented since the suspected food was not studied in the laboratory. In the outbreak to be reported, the jar containing the toxic pears and a collection of other home canned fruits and vegetables were found in the home of the victims. An opportunity was thus afforded to investigate some of the factors which may have induced the botulinum spoilage of the pears and at the same time to collect some data on the incidence of *Cl. parabolitum* in home preserved foods. The history of the poisoning cases which prompted the experiments to be reported is briefly as follows:

*Report 165.*—Bartlett pears, locally grown and home canned.

At noon, Saturday, May 21, 1927, Mrs. E. Rh. of Los Banos, California, prepared luncheon for the following persons: Mrs. E. Rh., age 27; Mildred Rh., age 9; Booth Rh., age 5; Mrs. H. Rh., age 18, and Albert Rh., age 5. Lunch consisted of bread, butter, new potatoes, macaroni and tomato sauce, and home canned pears. Mrs. E. Rh. opened one jar of pears and since she noticed a slightly abnormal odor, she tasted and swallowed a small piece of a pear. Her daughter, Mildred, also ate a slice. Mrs. H. Rh. tasted a very small piece of the fruit, but since it tasted very acid, she immediately spat it out and washed her mouth with water.

This jar of pears was placed to one side. Another jar was opened and served with the luncheon which was partaken of by the people mentioned above. About 5 p. m., May 21st, Mrs. E. Rh. and Mildred Rh. complained of pain in the abdomen, nausea, vertigo and dimness of vision. Mrs. E. Rh. requested to be taken to her mother's home, a distance of about 5 miles; she asked Mrs. H. Rh. to drive the automobile as she was unable to guide the car on account of seeing double. Mildred also complained of double vision. At the mother's house the patients

were seriously ill and a physician was called. A diagnosis of whooping cough in the case of Mildred and of early pneumonia in the case of Mrs. Rh. was made. A chiropractor was then called. By midnight, May 21st, both patients had general muscular weakness, paralysis of the throat muscles, inability to swallow, complete loss of vision, subnormal temperature, abdominal pain and constipation. Mildred Rh. was removed to the hospital at Los Banos and Dr. B. H. Bush called who made a diagnosis of botulism. The girl died at 6 p. m. Sunday May 22nd, 30 hours after ingestion of the poisonous pears. Mrs. E. Rh. was later also transferred to the hospital, where she died at 6 a. m. Monday May 23rd, 42 hours after the fatal luncheon. No antitoxin was administered.

Partial necropsies were performed at the request of the coroner. The stomachs and the two jars of pears implicated in the poisoning cases were sent to the Twinning Laboratory at Fresno. The report stated that the pyloric end of the gastric mucosa of both stomachs was congested and that the contents consisted of partially digested food, some pieces of pears and mucous. An examination for volatile, metallic and alkaloidal poisons proved negative. The toxin of *Cl. paratubulinum* was demonstrated in an enrichment culture of the gastric content. The pears of one jar were highly toxic for guinea-pigs on feeding and both the Twinning Laboratory and the Bacteriological Laboratories of the California State Department of Public Health demonstrated the presence of botulinum toxin type A in the syrup.

Subsequent investigations and information gathered from the relatives of Mrs. E. Rh. indicate that the fruit was packed during the 1926 season while the Rh. family were picking pears in the hills near Hollister and Los Banos. Mrs. H. Rh. the sister-in-law who was present at the luncheon remembered that the lid of the first jar which contained the poison was bulged and the rubber ring was not tight. A dozen or more jars of the home canned fruits had already been consumed during the winter 1926-1927 without any ill effects.

Nothing definite concerning the method of packing and sterilization could be determined. No boilers or containers large enough to sterilize properly any number of jars were found in the house; it is highly probable that the open kettle or hot-pack method was used for the preservation of the fruit. The contents of an assortment of dusty jars with fruits and vegetables found in the Rh. home were in various stages of fermentation.

*Laboratory Findings.*—The quart jar of home preserved pears was received through the courtesy of the California Department of Public Health. About one-tenth of the contents had been removed in the course of the previous examinations. The lid of the container was slightly bulged. On opening a strong rancid odor was noticed and the syrup was somewhat frothy. In color, consistency, and texture the slices of

Bartlett pears could not be distinguished from samples of uncontaminated canned fruit with which they were compared. The syrup, which contained a few small particles of the fruit, had a  $P_H$  of 3.86. Microscopic examinations revealed numerous short, thick and slightly curved, gram-positive rods arranged in pairs, and relatively few large single bacilli resembling *Cl. parbotulinum*. Yeast cells in various stages of budding but no molds were found. The MLD by subcutaneous injection of the syrup for mice was 0.0005 cc. and for guinea-pigs 0.001 cc. Animals injected with type A antitoxin survived the oral and subcutaneous administration of the toxic syrup.

In aerobic cultures a yeast and a facultative aerobic bacillus which closely resembled the bacterium recorded by Bergey as *Lactobacillus lactis acidii* were found. Ten grams of pear pulp heated at 80 C. for 30 minutes, and a similar unheated specimen enriched in beef heart peptic digest broth gave nontoxic cultures, which were readily purified in liver agar.<sup>1</sup> A slice of the pear was then pulped and suspended in a phosphate solution with a  $P_H$  of 7.0, heated at 70 C. for 30 minutes and then enriched. These cultures contained type A toxin and from them several pure strains of *Cl. parbotulinum* type A were obtained.

Both the toxic and the nontoxic strains gave identical cultural and biochemical reactions. The peptolytic activities as determined by Sørensen's formol titration were slightly lower than those generally encountered with the American type A strains. They were both agglutinated to the titer limit by a group 5 antiserum and gave cross reactions with type 1 serums. The thermal death time of the spores varied between 2 and 3 hours at 100 C.

Sixty-three jars of fruit, removed from the Rh. home, including peaches, pears, plums, blackberry jam (?), tomatoes, and pickles, were held at 37 C. for 6 months and then from 3 to 6 months at room temperature. Although the majority of the jars showed definite spoilage, leaky tops and broken rubbers, their contents were found to be nontoxic both by oral administration and by injection. A total of 32 jars including 21 jars of pears, 8 of peaches and 3 of tomatoes was cultured in beef heart peptic digest broth. Three jars of pears yielded toxic enrichment cultures of *Cl. parbotulinum* type A serologic group 5 identical with the organism isolated from the toxic pears responsible for the fatalities. The remaining 29 enrichment cultures were repeatedly

1. (Paper 34) J. Infect. Dis., 1929, 45, p. 79.



tested and found to be nontoxic. Since they contained a variety of aerobic and anaerobic bacteria it is not unlikely that the toxin production was either prevented or the formed toxin was destroyed by the enzymes of the concomitant bacteria.

An analysis of the data collected through various agencies and summarized in the preceding paragraphs conclusively establishes botulism due to home canned Bartlett pears as the cause of the deaths in the Rh. family. Although the fruit exhibited definite signs of spoilage and fermentation the mother and daughter tasted and swallowed portions of the sliced pears which contained a very potent toxin. Symptoms developed within 5 to 6 hours and death occurred in 30 and 42 hours respectively after the fatal luncheon. The clinical picture was identical with that previously recorded in botulism victims of this region. Moreover, the observations recorded by Peck<sup>2</sup> in the Sawtelle, California, outbreak in which 12 persons were ill and 11 died after eating home-canned pears were nearly duplicated. For example, the average length of time which elapsed between the taking of the food and the deaths was 40 hours, the shortest time being 25 hours and the longest 63 hours. In another botulism intoxication which took place at Colton, California<sup>3</sup> in March 1918 the patient at first developed gastrointestinal disturbances which were followed by the typical symptoms. At the end of 3 weeks he was much improved, although the eye symptoms persisted, and he eventually recovered. In the Sawtelle group as well as in the single intoxication at Colton, no bacteriological examinations were made and the evidence which connected these botulism cases with the canned pears was either the peculiar or sharp taste of the fruit or the fact that it was the only article of food of which all the victims had partaken. In the Los Banos cases the chain of evidence is complete. Not only were the poison and the anaerobe demonstrated in the fruit, but the bacillus was also found in the stomach contents of the victims. Furthermore 3 of the 21 jars of home preserved pears which were found in the household contained viable spores of *Cl. parabolulinum*. Unfortunately the method of preservation of the pears is not definitely known but the evidence suggests that the open kettle or hot-pack procedure was used.

In the light of this conclusive evidence that pears are liable to botulinum spoilage the following important questions suggested themselves: What are the general factors which enable *Cl. parabolulinum* to grow in pears which have as a rule a  $P_H$  below 4.5? Is the strain of

2. South. Calif. Pract., 1910, 25, p. 121.

3. Dickson: Arch. Int. Med., 1918, 22, p. 492.

*Cl. parabotulinum* isolated from the pears particularly well adapted for growth in this fruit? What is the thermal death time of the spores of the pear strain? Do the concentration, preparation, reaction and the buffer content of the syrup influence the growth of *Cl. parabotulinum* in pears? Did the concomitant growth of yeasts and lactobacilli encourage the production of the toxin?

In order to answer these questions a number of determinations and experimental canning tests have been conducted. Since it is generally believed that the acidity of the food governs the liability to botulinum spoilage, a series of  $P_H$  determinations on raw and canned pears were made.

#### ACIDITY OF BARTLETT PEARS

The extensive studies by Bigelow and Cathart<sup>4</sup> on the acidity of canned foods record the examination of two cans of New York and Maryland pears with a  $P_H$  of 3.90 and 3.59 respectively. Observations extending over 8 years indicate that the spores of *Cl. parabotulinum* unaided by other organisms would not germinate and elaborate their toxin at such a  $P_H$ . However, it is reasonable to suspect that the home canning open kettle method would not lower the  $P_H$  of Bartlett pears to such a degree, particularly if the water used for the syrup were alkaline or if the cane sugar were impure. Although neither the water nor the cane sugar employed by the housewife at Los Banos was available an attempt was made to imitate the conditions of home canning and to determine the  $P_H$  of the preserved pears at the various stages of preparation. With the assistance of P. J. Nealon the hydrogen-ion determinations have been made electrometrically. First, the juice of the raw fruit from different sources was extracted by pressing 10 peeled and sliced pears of each lot through cheese cloth. The following figures were recorded for the five samples: 1,  $P_H$  3.72; 2,  $P_H$  3.38; 3,  $P_H$  3.88; 4,  $P_H$  3.66; 5,  $P_H$  2.88 (cold storage pears).

In the next series pears were peeled and sliced, placed in enamel containers, covered with light (20%) or medium (40%) syrup, and boiled for 20 minutes. The commercial sugars were dissolved in tap water with a  $P_H$  of 8.0. A 20 to 40% cane sugar solution in this water gave a  $P_H$  of 7.70 to 8.10 before boiling and a  $P_H$  of 8.40 to 8.43 after boiling for 30 minutes. For the brown sugar the reactions were lower:  $P_H$  6.47 to 7.63 before and 6.11 to 7.54 after boiling.

4. Res. Lab. National Canner's Assn., Bull. 17-L, 1921, p. 12.

When combined with the sliced pears (average  $P_H$  of the juice 3.8) several different batches of syrup supplied the following data:

Pears with		$P_H$	
		Before boiling	After boiling for 20 minutes
20% cane sugar (light syrup)	(1)....	8.0	4.25
	(2)....	6.53	3.63
	(3)....	..	3.91
	(4)....	..	4.53
40% cane sugar (medium syrup)	(1)....	4.88	3.69
	(2)....	..	3.95
	(3)....	..	4.03
20% glucose .....		5.94	3.90
20% brown sugar .....		7.61	4.61
20% brown sugar .....		7.50	4.09
40% brown sugar .....		5.18	4.61

The average  $P_H$  of the contents in a set of 7 samples of commercially canned California Bartlett pears was 4.09.

The well known fact that the hydrogen-ion concentration of different samples of cooked or processed fruits may vary is fully confirmed by the experimental observations. A light syrup of cane sugar or a light or medium syrup prepared from commercial brown sugar, which is occasionally used by home canners, may not decrease the  $P_H$  of the final product into the range (4.0 to 4.5) in which the *Cl. parabolulinum* is regularly inhibited. The reaction of one or several jars may be rendered even more favorable if, unintentionally, other factors, such as residues from the soap or cleaning material adhering to the container, should reduce the natural acidity of the fruit. Furthermore, the reaction and buffer content of the water used may play an important rôle. A small sample of water collected at Los Banos had a  $P_H$  of 6.18 and was very well buffered. However, since it is unlikely that the pears were preserved at Los Banos, no further experiments were made with the sample. Comparative experiments with fruits grown on different soils, and packed with syrups made up with water from various localities are in progress.

If one admits that the spores of *Cl. parabolulinum* occasionally find a reaction favorable for germination, a knowledge of the degree of contamination and the average heat resistance of the organisms which caused the spoilage is desirable. Nothing is known concerning the source of the contamination; nor could it be determined whether it was light in the nontoxic jars and heavy in the poisonous jar; or whether the organisms were introduced with the raw material (pears, sugar, etc.) or with the dust and dirt clinging to the glass containers, the lids, or the

rubber rings. On the other hand it has been possible to determine the spore resistance of the Los Banos organism and to compare it with that of other strains.

THERMAL DEATH TIME OF THE SPORES OF THE  
LOS BANOS STRAIN

The spores for the experiments were produced in casein digest broth. The cultures were incubated for 7 days at 37 C. and then centrifugated in a Sharpless separator. Suspensions of the spores were prepared in phosphate solutions and in raw pear juice, mixed with an equal part of a 20% cane sugar syrup. They were sealed in 2 cc. amounts in Pyrex glass tubes, heated in boiling water and then subcultured in peptic digest beef heart broth. The technic was the same as that used by Esty and

TABLE 1.—HEAT RESISTANCE OF SPORES

Strain Tested	Millions of Spores per 1 Cc.	Medium in Which Spores Were Suspended	Resistance at 100 C. in Minutes	
			Positive	Negative
Pear strain toxic	696	Phosphate $P_H$ 7.0	210	240
Pear strain nontoxic	2,448	Phosphate $P_H$ 7.0	240	270
Pear strain toxic	350	Phosphate $P_H$ 7.0	120	125
Pear strain toxic	350	Raw pear juice $P_H$ 3.66	30	35
Pear strain toxic	350	Raw pear juice + 20% syrup $P_H$ 3.70	50	55
Cl. parabotulinum 62 mixture of several spore suspensions	648	Phosphate $P_H$ 7.0	120	125
Cl. parabotulinum 62 mixture of several spore suspensions	648	Raw pear juice $P_H$ 2.88	50	55

Meyer in their studies on the thermal death time of anaerobes. For comparison the spores of the nontoxic variants of the Los Banos strain and of a stock type A culture were included in the series. The toxicity of the enrichment tubes which showed growth was determined on mice. The results are summarized in table 1.

Before the data in table 1 are considered it is imperative to emphasize the fact that the production of botulinum spores which are resistant to high temperatures is not always successful (Esty).<sup>5</sup> No assurance can be given that the spores generated in the casein broth represented a sample of the most resistant spores which may be formed by the Los Banos strain. Even under the most suitable conditions highly resistant strains are liable to develop spores of average or low tolerance. In this connection it must be pointed out that the survival time of 210 minutes at 100 C. for 1,392 million spores in phosphate solution of  $P_H$  7.0 compares favorably with the average heat resistance of 43% of the Amer-

5. Jordan and Falk: *Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology*, 1928, p. 290.



ican type A strains tested by Esty and Meyer. A thermal death time of 50 minutes in pear juice mixed with an equal part of 20% cane sugar syrup with a  $P_H$  of 3.7 for a less resistant and less concentrated spore suspension is therefore quite significant. Furthermore, it is evident that not only the organism isolated from the toxic pears, but also other strains of *Cl. parbotulinum* type A withstand the temperature of boiling water for at least 50 minutes when suspended in acid pear juice. According to the various recipes<sup>6</sup> published for the benefit of housewives, pears are processed for from 20 to 30 minutes in boiling water irrespective of the size of the container and the heat penetration. Given a massive infection of the material the sterilization procedures employed in the home canning of pears in all probability fail to destroy the spores of the toxicogenic microbe. There is no doubt that the spores which have been found in the nontoxic jars survived the incomplete sterilization of the open kettle method. Since the rubber rings were tight and the contents of the jars were contaminated only with spore bearing organisms it is reasonable to conclude that the *Cl. parbotulinum* did not enter the container after the processing. However, mass contaminations similar in degree to those employed in the heat resistance tests are never encountered when the raw material is fresh and sound and ordinary sanitary precautions are employed in the course of the packing procedures.

The toxic jar of pears contained also a yeast and a nonsporulating aerobic rod. It occurred to the writers that the simultaneous occurrence of these organisms influenced the elaboration of toxin in under-processed pears. A series of tests therefore were undertaken to test this deduction.

PEARS AND PEAR JUICE ARTIFICIALLY CONTAMINATED WITH *CL.*  
*PARABOTULINUM* SPORES, YEASTS AND *LACTOBACILLI* AND  
PRESERVED BY THE OPEN KETTLE (HOT PACK)  
AND COLD PACK METHOD

*Series 1.*—In the first series firm, ripe Bartlett pears were peeled, carefully washed and either packed in pint jars or cooked for 8 minutes in boiling syrup and then distributed in containers. When the open kettle was used, the jars before they were filled were infected with 500 million heated, detoxified spores of *Cl. parbotulinum* Los Banos strain. Unheated spores were mixed with the sliced raw pears and heated with

6. Farmer's Bull., 1211, p. 42; 1471, 1926, p. 16, and Univ. California, Coll. Agric., circ. 276, 1928, p. 35.

the fruit when the cold pack method was tested. Various kinds of sugars in different concentrations were used as syrups. The  $P_H$  of each batch of pears was determined electrometrically both before and after cooking. The jars were incubated for 2 to 3 months at 37 C. The results of this experiment are summarized in table 2.

Only 8 jars of a series of 82 revealed definite growth. Although the syrup was nontoxic when injected in large amounts, microscopic as well as cultural examinations showed the presence of vegetative forms of the botulinum organisms and the absence of contaminating bacteria. Hence it is reasonable to attribute the gross fermentative changes to the growth of *Cl. paratubulinum*. Perhaps only the nontoxic variants which are known to be present in the Los Banos strain developed in the pears or the vegetative forms lost their power to form toxins when grown in

TABLE 2.—GROWTH OF *CL. PARATUBULINUM* IN CANNED PEARS

Syrup Used	Process	Inoculum	Number of Jars	Average $P_H$	Number of Jars Showing Growth
20% cane sugar	Cold pack	Unheated spores	5	4.25	2
20% cane sugar	Open kettle	Unheated spores	5	4.30	0
No sugar	Open kettle	Unheated spores	5	4.12	0
20% glucose	Open kettle	Unheated spores	5	5.94	0
20% brown sugar	Open kettle	Unheated spores	5	4.61	0
20% cane sugar	Open kettle	Heated spores	10	3.63	1
20% cane sugar	Cold pack	Unheated spores	8	3.75	0
40% cane sugar	Open kettle	Heated spores	10	3.60	0
40% cane sugar	Cold pack	Unheated spores	8	3.58	1
40% brown sugar	Open kettle	Heated spores	8	6.11	1
40% brown sugar	Cold pack	Unheated spores	8	6.20	2
20% cane sugar	Open kettle	Heated spores and yeast	5	—	1

this fruit. Unfortunately these interpretations of the negative results of the experimental series 3A could not be proven since the enrichment content of the jars with visible growth gave rise to toxic cultures. A second explanation is given under series 3.

*Series 2.*—Equally negative were the experiments with commercially canned pears. The lids of 15 cans of commercially packed Bartlett pears were punctured, the content seeded with approximately 500 million spores (10 cans with unheated, and 5 cans with heated spores) and the hole then covered with a drop of solder. After 20 to 21 months incubation at 37 C., 12 cans, including the 5 inoculated with heated spores, became swollen. On being opened they showed signs of fermentation, but no toxin was present. The average  $P_H$  was 4.8. In another series commercially canned pears were transferred aseptically to large Pyrex tubes inoculated with 50 million spores and stratified with vaseline. The tubes showed no growth after an incubation time of 2 to 3 months and were then discarded.

*Series 3.*—In another series of tests pear juice was extracted from ripe pears by boiling the sliced fruit for a few minutes with a small quantity of distilled water and pressing the liquid through cheese cloth. The buffer curve was determined and two batches of the juice were adjusted with dilute NaOH to  $P_H$  4.61 and 6.01 respectively. The raw juice with a  $P_H$  of 3.86 and the adjusted juice were tubed in 9 cc. amounts, stratified with vaseline and steamed for 30 minutes. Each set of tubes was divided into two lots, one of which was seeded with heated, detoxified spores and the other with young vegetative cells of *Cl. paratubulinum* (Los Banos strain). The spores failed to germinate even on prolonged incubation irrespective of the heavy inoculum they had received. Vigorous growth and gas production was observed in the tubes with a  $P_H$  of 4.6 and 6.0 when planted with a few vegetative organisms. Irrespective of the good growth the toxicity was very slightly if at all increased over the initial toxicity which was conferred to the pear juice through its inoculation with unheated organisms. This experiment indicates that heated spores of *Cl. paratubulinum* in pure culture are incapable of germination in pear juice with a  $P_H$  of 6.0 under the conditions of this particular experiment. Vegetative cells may multiply, and their ferments may be active in the adjusted pear juice but little or no toxin is elaborated under these conditions. Two explanations may be offered for this phenomenon. If toxins are formed they may be continuously destroyed by certain unknown substances of the pear juice. On the other hand the pear extract may be deficient in the elements (amino-acids, polypeptids) which serve as a matrix or as an activator for the toxin. Until these observations were made the writers have expressed the opinion that when type A or B strains exhibit good growth toxin production is readily demonstrated. This conclusion may apply to the mediums customarily employed in the laboratory for the production of botulinum toxin but it certainly is not confirmed by the experiments with pear juice. Subsequent observations have shown that the relative immunity of pears and other fruits from botulinum spoilage is probably due to the lack of suitable nutritive substances and not to their acidity. In this connection the next series of experiments is of interest.

*Series 4.*—Pears were cooked by the open kettle method; the slices were placed in large Pyrex test-tubes covered either with 20 or 40% syrup, stratified with vaseline and then sterilized in flowing steam for 20 minutes on 2 consecutive days. Series of 4 to 12 tubes each were then inoculated with 500 million heated (30 minutes at 80 C.) spores of

*Cl. paratubulinum* Los Banos or strain 78 type A alone, or with spores and 1/20 of a slant of the yeast isolated from the pears, or with spores and 1/20 of a slant of the lactobacillus, or with all three microorganisms in the proportion given. They were incubated for 5 days at 37 C. and then held at room temperature from 10 to 30 days. The results of these tests are presented in table 3.

It is evident from the data summarized in table 3 that only the tubes in which the yeast was present showed growth. A microscopic examination indicated that the spores of *Cl. paratubulinum* had germinated. However, only 32 (53.3%) of the 60 tubes with definite growth contained demonstrable botulinum toxin. In general the toxins were weak;

TABLE 3.—GROWTH AND TOXIN PRODUCTION OF *CL. PARATUBULINUM* IN PEARS

Inoculum *	Concentration of Sugar %	Number of Tubes in Series	Number of Tubes Showing Growth	Number of Toxic Tubes
Spores of <i>Cl. paratubulinum</i> isolated from pears				
Spores alone.....	20	4	0	0
Spores alone.....	40	4	0	0
With lactobacillus.....	20	4	0	0
With lactobacillus.....	40	4	0	0
With yeast.....	20	12	12	1
With yeast.....	40	12	12	7
With yeast and lactobacillus.....	20	12	12	7
With yeast and lactobacillus.....	40	12	12	9
Spores of <i>Cl. paratubulinum</i> type A group 1				
With yeast.....	20	4	4	0
With yeast.....	40	4	4	0
With yeast and lactobacillus.....	20	8	8	3
With yeast and lactobacillus.....	40	8	8	5

\* Approximately 500 million spores heated at 80 C. for 30 minutes were inoculated

from 0.1 to 0.2 cc. of the syrup was required to kill a mouse of 20 grams in 96 hours on subcutaneous injection. Since Schoenholz, Esty and Meyer <sup>7</sup> had previously noted the development of weak heat resistant poisonous substances in pears, neutralization tests were made with the toxic syrups. The production of a botulinum toxin in the tubes was only considered proved when the neutralization tests were conclusive.

The  $P_H$  values of the majority of tubes were determined before and after incubation. The average  $P_H$  of the tubes containing a light syrup (20%) was 4.44 before and 3.92 after incubation; with those containing a medium syrup (40%) the averages were 3.95 before and 3.63 one month after inoculation. The  $P_H$  values of the toxic syrups varied from 4.22 to 3.33. No relationship existed between the  $P_H$  and the toxicity. In certain series toxic and nontoxic tubes were encountered which gave the same  $P_H$  readings.

7. J. Infect. Dis., 1923, 33, p. 313.



The series which was prepared with a 40% cane sugar syrup yielded a larger number of toxic tubes than that containing only a 20% syrup. The simultaneous inoculation of both the yeast and the lactobacilli with the spores was more favorable for the elaboration of the toxin than when the spores were inoculated with yeast alone. Here again no correlation existed between  $P_H$  and the production of toxin. The concomitant growth of yeast, lactobacilli and spores, and not the hydrogen-ion concentration, apparently controlled the elaboration of toxin in the Bartlett pears.

Even more interesting are the tests with the type A strain 78, originally isolated from canned spinach. Toxin production was noted in about 50% of the tubes in which all three organisms developed simultaneously. Although growth took place in the pear juice seeded with the yeast and the spores, no toxin was formed. Unfortunately the series embraced only 8 tubes and final conclusions should be held in abeyance until the experiment shall have been repeated. However, it is definitely proved that the ability of *Cl. parbotulinum* to elaborate toxin in an acid fruit is not a property peculiar to the strain. It depends largely upon the bacteria, yeasts or molds which have survived the canning procedures or may have subsequently entered the container through leaky or carelessly cleaned and sterilized rubber rings. A true symbiotic interrelationship between the spores and the yeasts and bacteria is probably unnecessary. Any microorganism capable of growing in an acid fruit, for example molds, may furnish the factors or the food substances which are required by the *Cl. parbotulinum* for the production of its toxin. In the study of future poisoning cases due to acid fruits, pears, apricots, tomatoes, chili sauce etc. in which the injurious food may be available, it is obviously important to isolate and to study the action of the concomitant bacteria, yeasts and molds by methods similar to those outlined in this paper. In summarizing the experimental studies an answer may now be given to the five questions previously proposed:

The spores of the *Cl. parbotulinum* strain found in the poisonous Los Banos pears had survived a process of sterilization which in all probability was utterly inadequate since it permitted the survival of yeasts and bacilli of low heat resistance. The growth of these organisms supplied the factors which are required by the botulinum organism to germinate and to form its toxin. The concentration of the syrup, and the buffer content of the water may have been contributory factors. In the light of these experiments one may conclude furthermore that pears,

whether home or commercially canned, are not subject to botulinum spoilage provided fresh and sound raw material is packed under sanitary conditions. However, a jar with a layer of molds or definite signs of fermentation may contain the deadly poison. The contents should never be tasted but destroyed by mixing with kitchen lye or by boiling.

#### SUMMARY

A mother and a daughter tasted and swallowed portions of sliced home preserved Bartlett pears which had shown definite signs of spoilage and fermentation. Symptoms of botulism developed within 5 to 6 hours and death occurred within 30 and 42 hours respectively after the fatal meal.

The pears were probably preserved by the open kettle method. They contained a *Cl. parabolulinum* type A toxin (guinea-pig MLD, 0.001 cc.). The reaction of the syrup was  $P_H$  3.86. Aside from the toxicogenic anaerobe, a yeast and a representative of the *lactobacillus* group were isolated in pure culture.

Experimental studies have shown that the *Cl. parabolulinum* found in the spoiled pears produces spores which survive 2 to 3 hours boiling. They may germinate and elaborate the deadly poison in cooked Bartlett pears irrespective of the acidity, provided certain bacteria or yeasts are growing concomitantly.

Heated spores of *Cl. parabolulinum* failed to germinate in tubes of sterile pear juice with the  $P_H$  adjusted to 6.0. Although in several instances heated spores germinated and multiplied when inoculated into jars or cans of pears, no toxin was produced.

It is probable that certain fruits and acid vegetables owe their immunity from botulinum spoilage less to their acidity than to the absence of food substances essential to the elaboration of toxin.









MAXIMUM OXYGEN TOLERANCE OF CL. BOTULINUM  
A, B AND C, OF CL. SPOROGENES  
AND CL. WELCHII

K. F. MEYER

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California,  
San Francisco, California*

The recent communications by Dack, Starin and Werner<sup>1</sup> and Dack and Baumgartner<sup>2</sup> on the effect of reduced oxygen and carbon dioxide pressures on the growth of Cl. botulinum and Cl. sporogenes in veal infusion broth recalled certain experiments which had been conducted in this laboratory 6 years ago by Belle Anderson. Her untimely death prevented the completion of the studies in which she was so deeply interested. The data to be presented have been compiled from the carefully kept notes and the marginal annotations which the writer made during the course of the tests.

Relatively little information concerning the oxygen requirements of pathogenic anaerobic bacteria is available. From the older observations which may be found in the papers by Chudiakow,<sup>3</sup> Porodka<sup>4</sup> and Matzuschita<sup>5</sup> one may conclude that bacteria generally considered strictly anaerobic, may grow at certain minimal oxygen tensions. In connection with studies on the gas metabolism of anaerobes it appeared desirable to have further information on the oxygen tolerance of Cl. botulinum, since the aerobic index figures 5% to 10% (5 to 10 cm. atmospheric pressure) as determined by Dozier<sup>6</sup> in 1920 according to the method of Harris<sup>7</sup> for two strains were found to be too high. Subsequent tests leave no doubt that the majority of type A and B strains and particularly type C strains exhibit a much greater intolerance to oxygen than these earlier tests would indicate.

Several strains of Cl. botulinum, Cl. sporogenes and Cl. welchii grown in 2% peptone and 1% glucose broth (P<sub>H</sub> 7.2 to 7.4) were trans-

Received for publication, March 12, 1929.

1. J. Infect. Dis., 1927, 40, p. 525.

2. Ibid., 42, p. 491.

3. Centralbl. f. Bakterirol., 2 Abt., 1898, 4, p. 389.

4. Jahrb. wiss. Bot., 1904, 41, p. 212.

5. Arch. f. Hyg., 1902, 43, p. 267.

6. Dubovsky and Meyer: J. Infect. Dis., 1922, 31, p. 507.

7. J. Path. & Bacteriol., 1919, 23, p. 30.

ferred (0.1 cc. of a 24-hour old culture) into 50 cc. of the same medium held in 500 cc. Kjeldahl flasks and exposed to accurately controlled partial pressures of pure, washed anaesthetic oxygen. The flasks were evacuated by a first stage oil vacuum pump and finally by a Töpler mercury pump. The drop in mercury level of a barometer reading to 0.01 cm. indicated the oxygen intake through an accessory stock of the Töpler system. Comparative studies regarding the theoretical oxygen intake and the actual amount recovered indicate a 1 to 2% error in the percentages of atmospheric oxygen reported below. This error is accounted for by the large dimensions of the Töpler apparatus and the use of a 100 cc. gas analysis burette when only a total of 20 to 30 cc. of oxygen is contained in the culture flask. The gases of a completely exhausted flask were analyzed in order to compare the use of the  $O_2$  in the remainder of the series during the growth period of 6 days. The gradations in  $O_2$  pressures between flasks of the same series were kept as far as possible between 0.8 to 1 cm. differences in the barometric readings. Growth was noted between the 1st and the 6th day after inoculation. Prolonged incubation for several months did not change the end point of the oxygen tolerance of the strains. A glucose medium was chosen in order to obtain approximately 150 to 200 cc. of gas which was analyzed in the bureau of mines standard Burell apparatus. The technic of these analyses has been described by B. Anderson.<sup>8</sup>

The various species of organisms exhibit definite degrees of oxygen tolerance. *Cl. botulinum* type C strain Saunders is the least tolerant while the highly saccharolytic *Cl. welchii* will grow in at least 10 times as much  $O_2$  if not more. The summary of the end points of growth presented in table 1 substantiates the preceding statements.

*Cl. botulinum*, types A and B, will grow in approximately 7.5% of normal atmospheric  $O_2$  as a maximum while type C will only develop in less than 3% atmospheric  $O_2$ . The limited amount of  $O_2$  tolerated by *Cl. sporogenes* lies around 21%. Several strains gave similar mean values. The maximum tolerance for *Cl. welchii* has not been determined, however, it is worthy of note that one strain grew at 37.8% atmospheric  $O_2$ . This figure is practically double the oxygen limit found for *Cl. sporogenes* and indicates a new criterion of differentiation between saccharolytic and proteolytic metabolic activities. Although the procedures for the gas analysis never allowed the complete recovery of

8. J. Infect. Dis., 1924, 35, p. 213.

the theoretical amount of oxygen from the flasks, the ranges for the different species are far enough apart so that the error of 2% does not invalidate the evidence of differential  $O_2$  tolerance. The gas analysis gives indications that the oxygen acts as a H-acceptor in the sense of Wieland. Less hydrogen is formed in the absence of  $O_2$ .

A comparison of the data here presented with those reported by Dack, Starin and Werner reveals at first some disagreement, since no

## MAXIMUM OXYGEN TOLERANCE OF ANAEROBIC BACTERIA

Cl. parabotulinum 97 type A	grows at 1.08 cm. $O_2$ pressure or 6.75% of atmospheric $O_2$	while no growth occurred at 1.145 cm. $O_2$ pressure or 7.16% of atmospheric $O_2$
Cl. parabotulinum 53 type B	grows at 1.33 cm. $O_2$ pressure or 8.4% of atmospheric $O_2$	while no growth occurred at 1.36 cm. $O_2$ pressure or 8.6% of atmospheric $O_2$
Cl. botulinum Saunders type C	grows at 0.44 cm. $O_2$ pressure or 2.7% of atmospheric $O_2$	while no growth occurred at 0.61 cm. $O_2$ pressure or 3.8% of atmospheric $O_2$
Cl. sporogenes 46.....	grows at 2.99 cm. $O_2$ pressure or 18.88% of atmospheric $O_2$	while no growth occurred at 3.94 cm. $O_2$ pressure or 24.8% of atmospheric $O_2$
Cl. sporogenes 6.....	grows at 3.71 cm. $O_2$ pressure or 23.2% of atmospheric $O_2$	while no growth occurred at 4.535 cm. $O_2$ pressure or 28.4% of atmospheric $O_2$
Cl. welchii 10/46.....	grows at 4.25 cm. $O_2$ pressure or 26.8% of atmospheric $O_2$	
Cl. welchii 57.....	grows at 3.81 cm. $O_2$ pressure or 24.0% of atmospheric $O_2$	No end point of tolerance obtained as growth was so far above the expected range.
Cl. welchii 26.....	grows at 5.94 cm. $O_2$ pressure or 37.8% of atmospheric $O_2$	

differentiation between Cl. sporogenes and Cl. botulinum is given. They tested their organisms in veal infusion broth and found that air pressure of 4 cc. = 0.84 cm. pure  $O_2$  = 5.25% atmospheric oxygen favored regular growth in most cases within 1 to 2 days. No growth was obtained in any tube at pressures greater than 16 cm. = 3.36 cm.  $O_2$  or 21.1% atmospheric  $O_2$ . This figure is unquestionably too high for Cl. botulinum and too low for the strains of Cl. sporogenes used in this laboratory. On the other hand the observations of Dack and Baumgartner who found that Cl. parabotulinum Type A failed to grow in veal infusion broth without glucose when the oxygen pressure was greater than 1.3 cm. = 8.4% atmospheric  $O_2$ , corresponds well with



the results here reported for a type B strain. The aerobic index found by Harris for a strain *Cl. sporogenes* which grew when exposed to 6 cm. of pure oxygen cannot be harmonized either with the data detailed in this paper nor with the findings of Dack et al.

#### CONCLUSIONS

The growth of *Cl. botulinum* type C in 2% peptone, 1% glucose broth is inhibited by an oxygen pressure of 0.61 cm. or 3.8% atmospheric oxygen. *Cl. parabotulinum* type A and type B fail to grow when the tension exceeds 1.14 cm. and 1.36 cm. O<sub>2</sub> or 7.16% and 8.6% atmospheric O<sub>2</sub> respectively. *Cl. sporogenes* may tolerate as much as 3.71 cm. O<sub>2</sub> pressures or 23.2% atmospheric O<sub>2</sub>. *Cl. welchii* may exhibit vigorous growth at oxygen pressures which are greater than 5.9 cm. or 37.8% atmospheric O<sub>2</sub>.





4693

Further Studies on the Pathogenicity of *Br. Abortus* and *Br. Melitensis* for Monkeys.

K. F. MEYER AND B. EDDIE.

*From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, University of California, San Francisco, California.*

The following observations have been made in the course of preliminary studies with 48 cultures of the brucella group on 74 rhesus and 14 cynomolgus monkeys:

A single oral administration of 21 different *Br. abortus* strains produced in 24 *Macacus rhesus* and 1 *M. cynomolgus* monkeys non-febrile infections, followed by the formation of specific agglutinins of moderately high value. The dosage varied from 7 to 400 million and in some experiments it consisted of many billions. The strains identified serologically as abortus or para-abortus varieties and in the dye test as "bovis" or "melitensis" types had been isolated from bovine pathological specimens in the United States, Germany, Hungary, Italy and Switzerland.

Blood cultures have not been successful. The value of the serum agglutinins and their persistence depends on the feeding dose. Rapid disappearance of the agglutinative power to a low titer or to the zero point is worthy of note. A cutaneous application of approximately 20,000 bacteria has induced an infection. The incubation period as indicated by the appearance of the serum reaction varied from 9 to 30 days and is influenced by the infective dose. The absolute evidence of infection has been secured through the recovery of the organisms from the tissues of 4 monkeys which have been sacrificed on the 34th to 52nd day. Three animals killed on the 43rd, 56th, 199th day furnished sterile cultures. Probably every *Br. abortus* strain when fed in sufficiently large dosage is pathogenic provided susceptible monkeys are used.



## PROCEEDINGS

By feeding 100 million *Br. abortus* type "suis" of bovine, but in all probability of porcine origin which has retained its characteristics through the passage, a febrile disease with anatomical lesions indistinguishable from those of a *Br. melitensis* infection has been produced. During artificial cultivation the febrigenic properties on feeding have been lost but they have been retained when applied cutaneously. The milk of the cow which furnished one of the pathogenic "suis" strains has been consumed by a group of people without any bad effects.

An old laboratory culture of a *Br. abortus*, type "suis" of porcine origin infected via the alimentary tract when fed in large doses. The infection ran an afebrile course, stimulated after an incubation time of from 9 to 10 days a powerful agglutinative value of the serum with an abundance of specific organisms in the tissues.

A *Br. abortus* type "bovis" isolated from a swine foetus infected and immunized a monkey in a manner similar to that of the "bovis" types of bovine origin.

"Melitensis" strains of American origin possess a low virulence for monkeys; they may act like "bovis" cultures and they may lose their pathogenicity entirely within 6 months of artificial cultivation. Test-tube strains several years old are non-pathogenic and when administered by mouth they lack immunizing properties. One culture, which produced no lesions in guinea pigs by injection, infected a rhesus by mouth.

Tunisian strains of *Br. melitensis* fed or inoculated in doses of 100 million bacteria give rise to a febrile disease which is generally considered characteristic for this group of organisms. Even recently isolated strains may induce merely serologic but no febrile reactions.

A brucella organism serologically and biochemically an "abortus" and in its behavior towards dyes a "melitensis" type, acted like a typical melitensis by feeding and inoculation one month after isolation from a California case of undulant fever. In contrast 9 other strains kept under artificial cultivation for from 1 to 24 months and isolated from human abortus fever cases in Michigan, Iowa, Northern Germany and Denmark, infect monkeys when fed in a manner characteristic for the *Br. abortus*, "bovis" type.

Three *Br. abortus* type "suis" strains of human origin have not exhibited any striking pathogenicity or marked febrigenic properties neither by feeding nor by cutaneous or intravenous infection.

Serum agglutinins specific for the brucella group are formed only in the presence of a definite infection. The ingestion of heat killed

## PATHOGENICITY OF BRUCELLA

abortus bacilli with or without bile is antigenically ineffective in monkeys and rabbits.

Over 10% of the rhesus and cynomolgus monkeys possess a natural immunity against brucella infections via the alimentary tract. Animals which react to the oral administration of virulent abortus organisms with moderate and in general transitory serum reactions resist subsequent feeding infections with *Br. abortus* "bovis" and "suis" but not with a Tunisian *Br. melitensis*. Continuous ingestion of small numbers of abortus may lead to mild, unrecognized or "silent" yet immunizing infections. At least in one observation, the local and general immunity thus induced has been definite.



Sonderabdruck aus dem

Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde und Infektionskrankheiten.

II. Abteilung. 1929, Bd. 78.

Verlag von Gustav Fischer in Jena.

Nachdruck verboten.

## Certain Acid Tolerant Bacteria Causing Spoilage in Canned Foods.

By C. T. Townsend,

University of California, Laboratory for Research in the Canning Industries,  
San Francisco, California.

With 1 curve and 1 plate.

The attention of this laboratory has lately been drawn to spoilage organisms in acid canned foods, due to a number of losses which have been experienced by packers of products in this category. The spoilage includes softness in tomatoes, pears, pineapple, pimientos and chiles. The examination of a large number of flat cans and jars of pimientos and chiles revealed also a considerable number of hitherto unsuspected "flat sours" (cans in which spoilage occurs with the production of acidity; no gas is formed and the vacuum in the cans is little affected). The following investigation was undertaken to determine the nature of the spoilage organisms, their acid tolerance and their resistance to heat.

## General characteristics.

## Media used.

Except where otherwise mentioned, all the media were adjusted to pH 7.2, and sterilized for 30 minutes at 15 lbs. pressure. For the solid media 5% agar and 12% gelatin were used. For the determination of nitrate reduction 0.1%  $\text{NaNO}_3$  was added to the most suitable broth.

## 1. Nutrient broth.

Distilled water . . . . .	1000 cc
Beef extract (Liebig's) . . . . .	3 gm
Peptone (Difco) . . . . .	5 "

## 2. An adaptation of a medium known as "Cook's No. 2".

Distilled water . . . . .	1000 cc
Peptone (Difco) . . . . .	10 gm
Magnesium sulphate . . . . .	0.25 "
Dibasic potassium phosphate . . . . .	0.25 "
Glucose . . . . .	10 "

## 3. Devised for testing the fermentation reactions of group 2.

Distilled water . . . . .	1000 cc
Sodium ammonium phosphate . . . . .	5 gm
Beef extract (Liebig's) . . . . .	2 "
Glucose (or other carbohydrate) . . . . .	10 "

4. Beef heart peptic digest liver glucose broth<sup>1)</sup>.

## 5. Peptic digest liver agar.

Neutralized peptic digest (see medium 4) . . . . .	1000 cc
Dibasic sodium phosphate . . . . .	2 gm
Agar . . . . .	15 "

<sup>1)</sup> For principles involved see Holman, Journ. Bact. 1919. Vol. 4. p. 149; Pickel and Meyer, Journ. Inf. Dis. Vol. 23. 1918. p. 68; and H. H. Heller, Journ. Bact. Vol. 6. 1921. p. 445.



6. Casein digest<sup>1</sup>).

Make up a 1% sodium carbonate solution equal in volume to the amount of medium desired. To this add 10% casein and heat in a water bath or double boiler until the casein is well in suspension. Cool to about 40° C. and add  $\frac{2}{3}$  gm. of pancreatin (or trypsin) per liter. Distribute in flasks for digestion, using chloroform or toluene as preservative. Incubate over night (approximately 18 hours). Boil off the preservative and acidify strongly with 5 N hydrochloric acid (down to pH 5.6—5.2). Filter. Neutralize with 5 N sodium hydroxide, and add 0.5% Liebig's beef extract and 0.5% dibasic sodium phosphate. Make up to volume and check the reaction to pH 7.2—7.4. Sterilize at 15 lb. pressure for 45 minutes. 0.5% glucose added before sterilization for culture B 3 C.

## 7. Litmus milk.

Sufficient litmus solution was added to skim milk to give a good color, and enough normal sodium hydroxide to make the reaction neutral. The tubes were sterilized at 15 lb. pressure for 15 minutes.

## 8. Medium for formol titrations.

Beef extract (Liebig's) . . . . .	1.0%
Peptone (Difco) . . . . .	4.0%
Sodium chloride . . . . .	0.5%

## Technique.

**Isolation of the Organisms.** The tops of the cans were cleaned with cotton soaked in alcohol, flamed with a Bunsen burner, and the cans opened with a can-opener sterilized in the flame. Juice from the content was added to tubes containing No. 2 broth, nutrient glucose broth, and beef heart peptic digest liver broth (these last were boiled before inoculation and stratified with sterile vaseline after inoculation to give anaerobic conditions). Tubes of each medium were incubated at 30° C. and 37° C. The facultative anaerobes were purified by streaking on plates of No. 2 agar, and the anaerobes by making shakes in peptic digest agar.

**Gram Stain.** Ammonium oxalate crystal violet made up according to the directions given in the Manual of Methods of the S. A. B. was used with preparations from 18 hour cultures.

**Litmus Milk.** Tubes incubated for three weeks after inoculation.

**Liquefaction of Gelatin.** Inoculation by stabbing. The tubes were then held for six weeks at room temperature.

**Reduction of Nitrates.** Tubes of nitrate media were incubated for four days after inoculation. The presence of nitrites was determined by the sulphanilic acid and  $\alpha$ -naphthylamine test (according to the S. A. B. Manual of Methods).

**Production of hydrogen sulphide.** At the time of inoculation lead acetate paper was introduced into the tubes and held in position by the plugs. Blackening of the paper indicated the production of hydrogen sulphide.

**Indol Production.** A medium containing peptone or peptic digest liver broth was inoculated and incubated for five days. The Gneiss oxalic acid test (according to the S. A. B. Manual of Methods) was used.

**Composition of Gas.** 23—25 cc. samples of gas collected in an apparatus similar to a Smith fermentation tube were analyzed by the Mohr method.

**Inhibiting Effect of Brom Cresol Purple Indicator.** (Determined for the flat sour organisms only.) No. 2 broth was used.

<sup>1</sup>) Medium adapted by E. Wagner Sommer for the production of spores of *C. botulinum*.

containing different concentrations of the indicator. Transfers were made every 48 hours (incubation at 30° C.).

**Formol titrations**<sup>1)</sup>. 40 cc amounts of medium 8 were inoculated and held at 37° C. for C6 and B3C, and at 30° C. for B3B. 2 cc amounts from each tube were titrated on the first, third, seventh and fourteenth days.

### Experimental data.

The bacteria isolated have been divided into four groups on the basis of their morphological and cultural characteristics. These are summarized in Table 1.

#### Group 1.

Isolated from swelled cans of tomatoes, pears, pineapple<sup>2)</sup>, pimientos and chiles. Five cultures have been studied in detail.

**Morphology.** Small, Gram positive, coccoid bacilli, occurring singly, in pairs and in short chains. The paired formation is very characteristic, giving the organisms the appearance of slightly oval diplococci. On agar and in young broth cultures the dimensions are 1.2—1.5 by 0.8  $\mu$ . In older broth cultures the length may increase to 3.5  $\mu$ . Strains F 6, F 9 and F 11 are a little larger than B 1 and B 3 B. No spores have been observed.

**Growth requirements.** The organisms are facultative anaerobes growing well on the surface of No. 2 agar. They do not grow in nutrient agar or in nutrient broth, even with the addition of glucose. The optimum temperature is 30° C., with little or no growth at 37° C.

**Colonies.** Subsurface — lenticular. Surface — round, raised, glistening.

**Agar slants.** Unless there is a heavy inoculation the growth is usually somewhat scattered. There is no chromogenesis.

**Broth.** Turbid; granular growth.

**Motility.** Non-motile in young agar cultures.

**Gas Production.** Gas is produced in certain food juices, but not in artificial media.

**Litmus Milk.** There is considerable variation in the action of the different strains on litmus milk. Three strains do not grow in it at all, and of the other two which produce acid, reduction of litmus and coagulation, only one causes peptonization of the casein.

**Gelatin.** Only one strain causes liquefaction. This is the same strain that peptonizes the casein in milk, so it is evidently markedly proteolytic.

**Nitrates.** Not reduced (No. 2 broth).

**Indol.** Not formed (No. 2 broth).

**Viability.** Most of the strains soon die out on agar slants. Transfers should be made at least once a week.

#### Group 2.

Isolated from swelled cans of pimientos, pears and tomatoes. Three cultures were studied in detail.

**Morphology.** Similar to Group 1.

**Growth requirements.** The organisms are facultative anaerobes, growing well on the surface of solid media. They grow well on all ordinary media, and are able to utilize peptone as a source of both carbon and nitrogen. They grow well on synthetic media containing agar, with either sodium nitrate or sodium ammonium phosphate as a source of nitrogen. The optimum temperature is 37° C. although they grow rapidly at 30° C. and at room temperature.

**Colonies.** Subsurface — lenticular, with somewhat irregular outlines. Surface — round, raised, glistening.

**Agar slants.** Heavy, spreading, white growth. On agar containing glucose the growth is somewhat slimy. No chromogenesis.

**Broth.** Turbid; heavy growth.

<sup>1)</sup> For principles involved see Brown, J. H., Journ. Bact. Vol. 8. 1923. p. 255.

<sup>2)</sup> The pineapple strains were isolated while this paper was being written and have not been studied in detail. Sufficient information has been secured, however, to place them in Group 1.

Table I. General Characteristics.

Culture No.	Source (All Canned Foods)	Gram Stain	Spore Formation	Optimum Temp. ° C.	Motility	Oxygen Requirements	Composition of Gas per Cent		Litmus Milk	Liquefaction of Gelatine	Reduction of Nitrates	H <sub>2</sub> S Production	Indol Production	Group No.
							CO <sub>2</sub>	H <sub>2</sub>						
B 1	Pimientos	+	—	30	—	Facultative Anaerobe			No growth	—	—	—	—	1
B 3 B	"	+	—	30	—	Facultative Anaerobe			Acid, clot, reduction of litmus; partial peptonisation	+	—	—	—	
F 6	Tomatoes	+	—	30	—	Facultative Anaerobe			Acid, clot, reduction of litmus	—	—	—	—	
F 9	"	+	—	30	—	Facultative Anaerobe			No growth	—	—	—	—	2
F 11	"	+	—	30	—	Facultative Anaerobe			No growth	—	—	—	—	
C 6	Pimientos	+	—	37	+	Facultative Anaerobe	65	30	Acid, reduction of litmus clot. Few gas bubbles	+	+	—	—	
E 1	Pears	+	—	37	+	Facultative Anaerobe	56	38	Acid, clot. Reduction of litmus	+	+	—	—	3
F 10	Tomatoes	+	—	37	+	Facultative Anaerobe	61	31	Acid, clot. Reduction of litmus	+	+	—	—	
H 1	Chilis	+	+	30	+	Facultative Anaerobe			Acid, clot. Reduction of litmus	—	—	—	—	
H 2	"	+	+	30	+	Facultative Anaerobe			Acid, clot. Reduction of litmus	—	—	—	—	4
K 1	Pimientos	+	+	30	+	Facultative Anaerobe			Acid, clot, reduction of litmus. Marked separation of whey	—	—	—	—	
K 2	"	+	+	30	+	Facultative Anaerobe			Acid, clot, reduction of litmus. Marked separation of whey	—	—	—	—	
A 1	Pears	+	+	37	+	Obligate Anaerobe			Slight reduction of litmus. Slight gas	+	+	Trace	—	4
B 3 C	Pimientos	+	+	37	—	Obligate Anaerobe	20	75	Acid, clot, reduction of litmus	+	+	—	—	



**Motility.** Highly motile.

**Gas Production.** Gas produced in certain food juices and in all media containing carbohydrates. The ratio of  $\text{CO}_2$  to  $\text{H}_2$  is approximately 2 : 1.

**Litmus Milk.** Acid, coagulation, and reduction of litmus. One strain produces a little gas.

**Gelatin.** (Nutrient.) Liquefied.

**Nitrates.** Reduced to nitrites in No. 2 broth, but not in No. 3 broth.

**Indol.** Not formed (No. 2 broth).

**Viability.** Good. Transferring to fresh slants once a month is sufficient to keep the strains alive.

### Group 3.

Isolated from flat sour cans of pimientos and chiles. Four strains were studied in detail.

**Morphology.** Gram positive rods with rounded ends, 0.75 by 3—4  $\mu$  on agar, and 0.75 by 4—6  $\mu$  in broth. As the cultures become older the rods appear more slender and become granular. Long involution forms sometimes occur. Very few spores are formed on artificial media. Only two or three have been observed; these appeared to be central and oval. The rods were not swollen.

**Growth requirements.** The organisms are facultative anaerobes growing well on the surface of media containing glucose. Medium No. 2 gives the best growth. The optimum temperature is 30° C.; very poor growth at 37° C.

**Colonies.** Subsurface — lenticular. Surface — hemispherical in shape; somewhat opalescent.

**Agar slants.** White, somewhat scattered growth, except with a heavy inoculation. No chromogenesis.

**Broth.** Heavy growth with a flocculent precipitate.

**Motility.** The organisms are motile.

**Gas.** Not produced in any food juice or artificial medium used.

**Litmus milk.** Acid, coagulation, and reduction of litmus.

**Gelatin.** Not liquefied. (Medium No. 2.)

**Nitrates.** Not reduced. (Medium No. 2.)

**Indol.** Not formed. (Medium No. 2.)

**Brom Cresol Purple indicator** completely inhibits growth in No. 2 broth in a concentration of 1 : 5000. A concentration of 1 : 10 000 allows of very slight growth, but the organisms soon die out.

**Viability.** Fair. Strains should be transferred to fresh slants every two weeks.

### Group 4.

Isolated from swelled cans of pears and pimientos. Only two strains have been obtained, one of which (A 1) died out before much could be done with it.

**Morphology.** Strain A 1. Large Gram positive rods becoming clostridia at sporulation. The rods often grow to great lengths, giving somewhat the appearance of actinomyces filaments. They become very granular with age. The spores are oval.

Strain B 3 C. Gram positive rods, becoming clostridia at sporulation. The ends are rounded in older cultures, but in young cultures they are often square. The rods are 1.0  $\mu$  in dia., and vary in length from 2—4  $\mu$  in young cultures up to 10—20  $\mu$  in old cultures. The spores are oval, and measure 1.5 by 1.0  $\mu$ .

**Growth requirements.** The organisms are obligate anaerobes, giving the best growth in medium No. 4. Their optimum temperature is 37° C.

**Colonies.** Strain A 1. Subsurface — somewhat irregular central mass with woolly outgrowths.

Strain B 3 C. Subsurface — lenticular with irregular outgrowths.

**Gas.** Both strains produce gas from pimiento juice.

**Litmus milk.** A 1. Slight reduction of litmus and slight gas production. B 3 C. Acid, coagulation, reduction of litmus and peptonization of casein. The following characteristics apply to B 3 C only:

**Gelatin** (nutrient). Liquefied.

**Nitrates.** Reduced to nitrites in medium 3, but not in medium 2.

**H<sub>2</sub>S** (medium 4). A slight darkening of the lead acetate paper was noted.

**Indol.** Not formed (medium 4).

**Gas.** The ratio of  $\text{H}_2$  to  $\text{CO}_2$  is 3.75 : 1.

Strain A 1 ferments glucose with the production of acid and gas.



### Fermentation of carbohydrates

The following media were used for the different groups:

Group 1 No. 2,  
Group 2 No. 3,  
Group 3 } No. 1.  
Group 4 }

With group 2 it was impossible to use a medium containing peptone, as this is utilized as a source of carbon and nitrogen, acid being formed first and then alkaline waste products. Medium 3 was devised for testing the fermentation reactions of this group. Without a carbohydrate it gives good growth with little or no change in pH.

### Preparation of media.

The medium in each case was sterilized in small flasks. 10% solutions of the carbohydrates in distilled water were sterilized by heating for 20 minutes at 100° C. 1.0 cc of the carbohydrate solution was added to each 9 cc of medium giving a 1% concentration of carbohydrate. The medium was tubed in 3 cc amounts through sterile funnels into sterile test tubes. Tubes for Group 4 were stratified with sterile vaseline after filling, and heated in boiling water for five minutes. All tubes were incubated for 24 hours at 37° C as a sterility test.

### Inoculation.

18 hour cultures were used; groups 1, 2 and 3 on agar slants, and group 4 in No. 4 broth. The first three groups were inoculated by means of a needle, and group 4 by Pasteur pipettes. Each test was run in duplicate.

Table 2. Fermenta

Culture No.	No Carbo- hydrate	Xylose	L. Ara- binose	Glucose	Levulose	D. Galactose	Lactose	Sucrose	Maltose
Uninoculated . . .	7.4	7.4	7.0	7.4	7.2	7.0	7.4	7.4	7.4
B 1 . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	4.8	4.2	4.0	4.0	5.0	7.4 <sup>1)</sup>	4.0	4.2
B 3 B. . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	5.4	5.2	4.4	4.0	4.2	4.4	6.4	4.1
F 6 . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	5.2	5.2	4.0	4.0	4.0	4.0	4.1	4.0
F 9 . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	4.4	4.6	4.4	4.7	5.0	7.4 <sup>1)</sup>	4.6	4.6
F 11 . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	4.6	4.6	4.4	5.0	5.0	7.4 <sup>1)</sup>	4.5	4.8
Uninoculated . . .	7.4	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2	7.2
C 6 . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	4.6G	4.5G	4.6G	4.4G	4.6G	4.5	4.5G	4.6G
E 1 . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	4.4G	4.4G	4.4G	4.4G	4.4G	4.6G	4.4G	4.6G
F 10 . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	4.4	4.4G	4.7G	4.4G	4.6G	4.7G	4.7G	4.6G
Uninoculated . . .	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	7.4	7.6
H 1 . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	7.0 <sup>1)</sup>	7.6 <sup>1)</sup>	4.5	4.3	4.4	4.5	4.4	4.4
H 2 . . . . .	7.6 <sup>1)</sup>	7.6 <sup>1)</sup>	7.6 <sup>1)</sup>	4.4	4.4	4.6	4.6	4.4	4.4
K 1 . . . . .	7.6 <sup>1)</sup>	7.6 <sup>1)</sup>	4.8	4.4	4.4	4.7	4.6	4.4	4.6
K 2 . . . . .	7.6 <sup>1)</sup>	5.0	4.6	4.2	4.4	4.4	4.4	4.6	4.6
B 3 C . . . . .	7.4 <sup>1)</sup>	5.2	5.2	4.4	4.4	4.4	4.6	4.4	4.4
B . . . . .	B	B	B	3.5	3.0	4.4	3.5	4.0	3.0

<sup>1)</sup> Negative fermentation.

Incubation and pH.

Tubes of groups 1 and 3 were incubated at 30°C. for 4 days and of groups 2 and 4 at 37°C. for 48 hours. The pH was then determined by the addition of a suitable indicator and comparison with color standards.

Results.

The results are summarized in Table 2. The figures show the pH values at the end of the incubation period. "G" indicates gas production, except with strain B3C, where the second row of figures gives the number of cm. of gas formed from 2.5 cm. of medium (the tubes used were 11 mm inside dia.). "B" indicates bubble.

In groups 1, 2 and 4 the organisms are remarkably saccharolytic, all the carbohydrates used being fermented, except by three strains in group 1, which do not ferment lactose. These are the same strains that fail to grow in litmus milk.

In group 3, the flat sours, rhamnose and dulcitol are not attacked. There is a good deal of variation in the ability to ferment the pentoses, the alcohols, dextrin and salicin. The remainder of the carbohydrates used are fermented by all four strains.

Digestion of Protein.

Preliminary determinations were made on the proteolytic powers of three strains, B3B, C6 and B3C, on peptone. The formol titration method was used with medium 8. The results are shown in the accompanying graph.

The figures obtained show that all three strains are only slightly proteolytic. After the seventh day strain C6 rapidly breaks down the amino acids

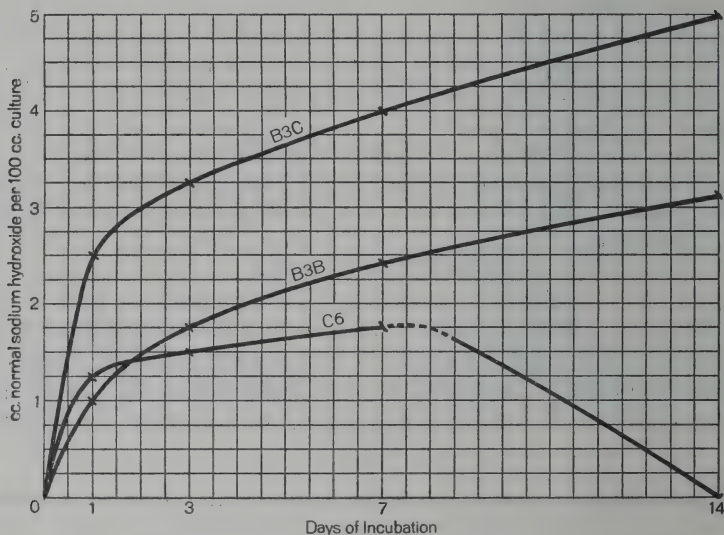
carbohydrates.

Raffinose	Inulin	Dextrin	Starch	Salicin	Glycerol	Mannitol	Dulcitol	Sorbitol	Group
7.2	7.0	7.0	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.2	1
5.2	5.2	5.2	5.1	4.6	5.2	5.4	5.2	5.2	
5.2	5.0	4.4	5.2	4.4	5.2	4.8	5.2	4.6	
4.5	5.0	4.2	5.1	4.1	5.2	5.6	5.2	4.4	
5.2	5.2	5.0	5.0	4.7	5.0	5.0	5.2	5.0	
5.2	5.0	5.2	5.1	4.7	5.1	5.2	5.0	5.2	
7.2	7.2	7.0	7.2	7.0	7.2	7.2	7.2	7.2	2
4.6G	5.2	5.2	5.0	4.6G	5.0	4.6G	5.2	4.6G	
4.4G	5.2	5.1G	5.0	4.6G	4.8G	4.6G	4.8G	4.7G	
4.6G	5.0	5.2	5.0	4.5	4.8	4.6G	5.0	4.7G	
7.6	7.4	7.6	7.4	7.6	7.6	7.6	7.6	7.6	3
5.2	4.8	7.6 <sup>1</sup> )	4.4	7.6 <sup>1</sup> )	7.6 <sup>1</sup> )	7.6 <sup>1</sup> )	7.6 <sup>1</sup> )	7.6 <sup>1</sup> )	
4.6	5.0	4.4	4.4	7.6 <sup>1</sup> )	4.8	5.2	7.6 <sup>1</sup> )	7.6 <sup>1</sup> )	
4.8	5.0	4.4	4.4	7.6 <sup>1</sup> )	4.4	4.6	7.4 <sup>1</sup> )	5.2	
4.4	5.2	4.6	4.6	5.2	4.6	5.0	7.6 <sup>1</sup> )	7.6 <sup>1</sup> )	
4.8	5.2	4.8	4.8	5.2	5.2	5.2	5.0	5.2	4
2.6	0.4	4.5	2.5	0.7	0	B	B	B	

formed up to that time, giving a negative value on the fourteenth day. This probably accounts for the alkalinity produced by this organism after several days incubation in media containing peptone.

#### Acid tolerance.

Table 3 shows the pH range<sup>1)</sup> of normal cans of the food products from which the bacteria studied were isolated. With the exception of the pineapple which was packed in Hawaii, all the products were packed in California. The pH of all canned foods varies with the variety of the raw material, the strength of the syrup, and the process used.



Curve 1. Formol titration curves. Strains B3B, C6 and B3C.

Table 3. The pH range of normal cans of the products studied.

Food	pH Range
Tomatoes . . . . .	4.0 to 4.5
Pears . . . . .	4.1 to 4.5
Pineapple . . . . .	3.5 to 4.1
Pimientos . . . . .	4.7 to 5.2
Chiles . . . . .	4.8 to 5.6

In view of the high acidity of some of the foods in which spoilage occurred the tolerance of the facultative anaerobes to acetic, citric and hydrochloric acids was determined. No. 2 broth was used as a base. From titration curves for the three acids in this medium the amounts of normal acid required to produce the different pH values were estimated. All the different lots of media were sterilized at 15 lbs. pressure for 15 minutes. When cool, the pH

<sup>1)</sup> The figures are those obtained by the National Canners Association Laboratory Western Branch, from the examination of large numbers of normal cans of food by the electrometric method.

of one tube from each lot was determined electrometrically. All tubes were inoculated from 18 hour cultures on No. 2 agar slants. Groups 1 and 3 were incubated at 30°C. and group 2 at 37° C. Incubation was continued for two weeks, as in the tubes with low pH values there was considerable retarded germination. Growth was determined by turbidity. All tests were run in duplicate.

Table 4 gives the lowest pH value at which growth occurred, together with the next lower pH value.

Table 4. Tolerance of Groups 1, 2 and 3 to Acetic, Citric and Hydrochloric Acids.

Culture No.	Acetic Acid		Citric Acid		Hydrochloric Acid		Group
	Growth pH	NoGrowth pH	Growth pH	NoGrowth pH	Growth pH	NoGrowth pH	
B 1	4.41	4.21	4.54	4.26	4.30	4.07	1
B 3 B	4.52	4.41	4.54	4.26	4.47	4.30	
F 6	3.96	3.71	3.21	2.99	3.41	3.24	
F 9	3.96	3.71	3.87	3.64	3.92	3.60	
F 11	4.03	3.96	3.64	3.40	3.92	3.60	
C 6	5.02	4.85	4.26	3.87	3.92	3.60	2
E 1	5.02	4.85	4.26	3.87	3.92	3.60	
F 10	5.02	4.85	4.26	3.87	3.92	3.60	
H 1	4.41	4.21	4.65	4.54	4.30	4.07	3
H 2	4.41	4.21	4.65	4.54	4.30	4.07	
K 1	4.41	4.21	4.54	4.26	4.30	4.07	
K 2	4.41	4.21	4.65	4.54	4.47	4.30	

The strains within groups 2 and 3 show very little variation from one another and the grouping is constant for all three acids. Group 1, however, is divided into two parts, one considerably more acid tolerant than the other. The former strains were obtained from tomatoes and the latter from pimientos. The tomato strains in group 1 show a good deal of variation in the tolerance to citric acid. The flat sour organisms differ from the others in being most inhibited by citric acid.

The most remarkable fact brought out by this experiment is the extreme tolerance to acid of some of the strains in group 1, particularly F 6. After growth the pH is still further reduced, in one case from an initial pH with citric acid of 3.21, down to 3.12 after growth (determined electrometrically). All the strains in group 1 and 3 lower the pH value of the medium. Those in group 2, however, produce alkaline waste products from the peptone, consequently raising the pH.

#### Heat resistance studies.

Preliminary runs have been made on one or more strains from each group. The method used was that of Bigelow and Esty<sup>1</sup>). All strains were heated in the standard phosphate solution (mixture of  $\frac{1}{15}$  M.  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  and  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  to give a pH of 7.0), and two strains also in pimientto juice, pH 4.93. This was prepared by pressing the juice out of raw peeled pimientos and straining through cheesecloth.

<sup>1</sup>) Journ. Inf. Dis. 1920. Vol. 27. p. 602.



## S u s p e n s i o n s .

B 1, B 3 B and F 6 grown on No. 2 agar in Kolle flasks for 24 hours at 30° C.

C 6 grown on nutrient agar in Kolle flasks for 24 hours at 37° C.

H 1 grown on No. 2 agar in Kolle flasks for three days at 30° C.

B 3 B grown in medium 6 (stratified with vaseline) for four days at 37° C.

All strains were washed once in physiological salt solution and centrifuged. They were then suspended in phosphate or pimiento juice.

## C u l t u r i n g   a f t e r   h e a t i n g .

Strains from groups 1, 2 and 3 were cultured into No. 2 broth. Tube containing B 3 C were cultured into No. 4 broth and stratified with steril vaseline.

## D e t e r m i n a t i o n   o f   g r o w t h .

B 1, B 3 B and F 6 — after 7 days incubation at 30° C., all the tubes were tested with brom-cresol-purple indicator. If any growth had occurred the reaction was markedly acid.

C 6 — growth determined by gas production and turbidity.

B 3 C — growth determined by the lifting of the vaseline plug due to the production of gas.

The results of the heat resistance tests are summarized in Table 5.

Table 5. Heat Resistance Data.

Culture No.	Temp. ° C.	Suspension Medium	No. of Organisms per cc. of Suspension <sup>1)</sup>	No. of Tubes per Set	Survival Time in Min.	No. of Tubes Posit.	Destruction Time Min.	Group
B 1	60	Phosphate	185 million	2	4	1	6	1
B 3 B	60	"	100 "	2	—	—	10	
	70	Phosphate and pimiento juice	130 "	2	—	—	2	
F 6	60	Phosphate	105 "	2	2	2	4	
C 6	60	"	1000 "	2	—	—	2	2
B 3 C	100	"	500 (spores)	3	13	1	16	4
	100	Pimiento juice	500 "	3	13	1	16	
H 1	100	Phosphate	400 "	2	16	1	19	3

<sup>1)</sup> 2 cc. of suspension heated in each tube.

The results indicate that groups 1 and 2 are very sensitive to heat, four minutes at 60° C. being the longest survival time obtained with the four strain tested.

The anaerobe B 3 C survives 13 minutes at 100° C. in both pimiento juice and phosphate, using only 1000 spores. The flat sour H 1 is quite resistant survival being obtained up to 16 minutes, using only 800 spores.

## D i s c u s s i o n .

All the organisms isolated are predominantly saccharolytic, with only slight proteolytic powers; only two strains digest casein. They are all very acid tolerant, particularly those in group 1. From the results obtained it i

doubtful if any canned food, on the basis of acidity alone, could inhibit the growth of all the members of this group.

The resistance to heat of groups 1 and 2 appears to be low, and the occurrence of spoilage due to these organisms indicates either gross understerilization or contamination after processing, due to defective can seams. The pores of the flat sours and the anaerobe B 3 C, however, are sufficiently heat resistant to withstand the processes at present in use for chiles and pimientos. (B 3 C may not be very significant as a spoilage type for these products, as it has only been found once.) The present boiling water cooks for pimientos and chiles are only estimated to raise the temperature at the center of the cans to 210° F. by the end of the cook. The processes at present in use are considered to be the maximum that can be used without spoiling the product. The spores of the flat sour organisms require 19 minutes at 212° F. to destroy them, so unless they are eliminated at their source they will continue to be a spoilage hazard.

### Classification.

Owing to the small number of strains studied no attempt has been made to classify them. Very little work has been done on the systematic classification of the non-toxic spoilage organisms, and what there is is scanty and unrelated. It is suggested that some central organization be entrusted with the task of collecting cultures of such spoilage organisms and of typing them according to a standard procedure. This would eliminate a great deal of the duplication of work which now occurs, and a system of classification could be arrived at based on the examination of large numbers of strains according to standard methods.

### Summary.

Acid-tolerant spoilage organisms from swelled cans of tomatoes, pears, pineapple, pimientos and chiles, and from flat sour cans of pimientos and chiles have been isolated and studied. They have been divided into four groups as follows:

Group 1. Facultative anaerobes. Small Gram positive coccoid bacilli, producing gas in certain food juices but not in artificial media. They do not produce spores and are non-motile. They are saccharolytic and some strains are remarkably tolerant to acids. The resistance to heat is very low.

Group 2. Facultative anaerobes. Small Gram positive, non-spore forming, motile coccoid bacilli. They are very saccharolytic and produce a great deal of gas. The heat resistance is very low.

Group 3. The flat sour organisms. Facultative anaerobes. Short Gram positive motile rods, forming central spores. They are very saccharolytic, but do not produce gas. A resistance to heat of 16 minutes at 100° C., using 800 spores, has been obtained.

Group 4. Obligate anaerobes. Form clostridia at sporulation. Small to long Gram positive rod with oval, subterminal spores. They are very saccharolytic, with the production of much gas. The resistance to heat of one strain is 13 minutes at 100° C., using 1000 spores.

#### Conclusions.

1. Some of the strains isolated are sufficiently acid tolerant to grow in almost any canned food if the medium is otherwise suitable.

2. Spoilage due to the non-spore forming, coccoid bacilli (groups 1 and 2) indicates either gross understerilization or defective can seams.

3. The present cooks on pimientos and chiles which only raise the temperature in the center of the can to 210° F. by the end of the cook, are not sufficient to give a commercially sterile product if any considerable number of spores of the flat sour organisms (group 3) is present.

#### Explanation of Plate.

All colonies magnified 22 times, and all bacterial cells 700 times. All microscopic preparations stained by Gram's method, using carbol fuchsin as a counterstain.

Fig. 1. Subsurface colonies of strain B 1 grown in No. 2 agar for 48 hours at 30° C.

Fig. 2. Subsurface colonies of strain C 6 grown in No. 1 agar for 24 hours at 37° C.

Fig. 3. Subsurface colonies of strain H 1 grown in No. 2 agar for 48 hours at 30° C.

Fig. 4 and 5. Strains B 1 and B 3 B grown on No. 2 agar slants for 48 hours at 30° C.

Fig. 6. Strain B 3 B grown in No. 2 broth for 24 hours at 30° C.

Fig. 7. Strain F 6 grown on a No. 2 agar slant for 48 hours at 30° C.

Fig. 8. Strain C 6 grown on a No. 1 agar slant for 24 hours at 37° C.

Fig. 9. Strain H 1 grown on a No. 2 agar slant for 48 hours at 30° C.

Fig. 10 and 11. Strain A 1 grown in No. 4 broth for 5 days at 37° C.

Fig. 12. Strain B 3 C grown in No. 4 broth for 6 days at 37° C.



Fig. 1



Fig. 2

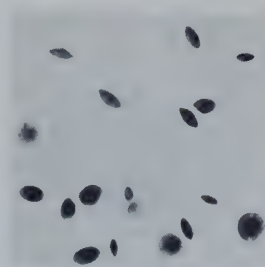


Fig. 3



Fig. 4



Fig. 5



Fig. 6

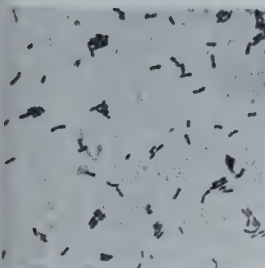


Fig. 7

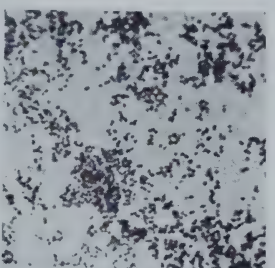


Fig. 8

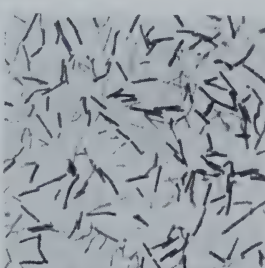


Fig. 9

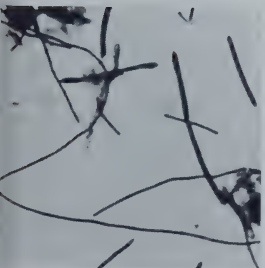


Fig. 10

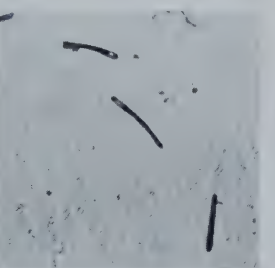


Fig. 11

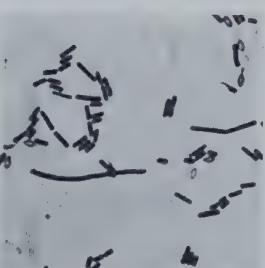


Fig. 12





4156

Studies on the Heat Resistance of Spores of *B. Subtilis*.

O. B. WILLIAMS. (Introduced by Karl F. Meyer.)

*From the Division of Bacteriology, University of California Medical School,  
San Francisco.*

This report presents in summary form the results of a study of the survival time of *B. subtilis* spores produced under a wide variety of nutritive and environmental conditions and exposed to high temperatures. The basic resistance has been defined as the resistance of a suspension of a definite density, produced and tested under certain standard conditions. The basic resistance of the strain employed was 6 minutes at 105° C., 14 minutes at 100° C., and 35 minutes at 95° C. Most of the determinations were made at 100° and 95°.

Pronounced deviations from the basic resistance have been produced by changing the nutritive substratum. The kind of peptone used has been found to be significant, but the resistance appears to have been independent of the concentration of the peptone.

Spores of diminished resistance were formed in all digest media tested with the exception of casein digest, which yielded spores of an enhanced resistance. The explanation of this probably rests on the difference in phosphate content of these media. Very resistant spores were formed in isoelectric gelatin. Evidence which has been acquired indicates that this was probably due to the low salt content of this medium. Infusions of vegetable matter were found to be excellent media. Spores of high resistance were formed in these media in all cases. Slightly more resistant spores were formed in liquid media than in solid media. Cultivation in the presence of a suitable concentration of either phosphate or magnesium resulted in the formation of spores considerably more resistant than the normal spores. Spores slightly more resistant than normal were

## SCIENTIFIC PROCEEDINGS

formed in the presence of calcium or iron, and also by cultivation in physiologically balanced solutions. The increase in these cases, however, was not pronounced. A number of inorganic salts were found to be without influence on the resistance of spores produced in media to which they had been added. Media enriched by the addition of certain organic substances were found to yield spores greater in resistance than the normal. Of especial significance in this connection may be mentioned available carbohydrates and certain organic and amino acid radicles.

No correlation was apparent between the extent of growth or sporulation and the resistance of the spores produced. The initial reaction of the medium in which the spores were formed was found to be without influence. The temperature of cultivation, however, was found to be of considerable significance, the higher temperatures resulting in spores of an enhanced resistance. Cultivation in a medium with the surface tension reduced by the addition of bile resulted in spores of normal resistance. It was found that the time necessary to sterilize a suspension at a given temperature increased, as the concentration increased. With uniform concentrations the time necessary to sterilize decreased as the temperature increased.

No effect was apparent as a result of heating in a solution of increased density, or in tubes of different lengths. Exposure of the cultures to X-rays before incubation had no effect on the resistance of the spores produced. Evidence has been acquired which emphasizes the necessity of using strained suspensions in heat resistance tests. Irregular and erroneous results will be obtained unless this precaution is observed. Confirmation of the results of previous workers on the disinfecting action of the hydrogen and hydroxyl ions has been obtained.

Desiccated spores exhibited a resistance in excess of that exhibited by young, moist spores. Spores stored for an equal length of time in a moist condition were not, however, appreciably changed in resistance. The course of mortality, as determined by quantitative plating at various time intervals, was not of such a nature that it could be described by the equation for a first order chemical reaction. Dormancy, either of heated or unheated spores, was not exhibited by the culture used in this study.

The resistance of the spores was increased by a process of selection of resistant cells. Efforts to increase the resistance by cultivation in media which regularly yielded spores of an enhanced resistance were not successful. Attempts to produce spores in any appreciable quantity in synthetic media prepared from highly purified chemicals met with failure.

## SCIENTIFIC PROCEEDINGS

Evidence gleaned from the literature and accumulated during the progress of this work supports the idea that the cause of death in cells exposed to a high temperature is the coagulation of bacterial protein. Conditions which render protein more difficult to coagulate consequently result in an increased resistance to heat. The water and the ash content of the cell appear to be especially important in this connection. However, cultivation under certain nutritive conditions which do not appear to be intimately related to either the water or ash of the cell has invariably resulted in the production of resistant spores.





## THE HEAT RESISTANCE OF BACTERIAL SPORES

O. B. WILLIAMS

*From the Division of Bacteriology, University of California Medical School, Berkeley, and the Department of Botany and Bacteriology of the University of Texas, Austin*

The literature on the subject of the heat resistance of bacteria is full of contradictions and discrepancies from the records of the earliest workers to those of the present day. This lack of uniformity has been due in part to strain variations within the same species, in part to the use of faulty methods, and in part to factors of unknown nature. Until a thorough understanding of the factors operative in the thermal resistance of bacteria is acquired, it will not be possible to control by other than empirical methods the processes which require for their success the destruction of bacteria by moist heat. The present study was undertaken in order to determine the effect of various factors, chiefly nutritive, on the heat resistance of bacterial spores, with the expectation that the results obtained would clarify to some extent certain of the causes of variation and perhaps shed additional light on the nature of thermal resistance. While it was obviously not possible to exhaust all phases of the subject, a considerable quantity of new data has been accumulated as a result of the present investigation.

*The Organism.*—It is desirable that the test organism in comparative thermal death time determinations be one which grows readily on the ordinary culture medium, with the production of an abundant yield of spores in a minimum of time. It should, furthermore, be an organism which has a characteristic type of growth, or should possess some readily determinable characteristic which will serve to differentiate it from contaminants likely to be encountered. For the major portion of the work here reported, the test organism was *Bacillus subtilis*. This form is so well known that a description of its physiologic and biochemical characteristics would be superfluous. The strain used was one which had been isolated at the George Williams Hooper Foundation from canned olives. Preliminary determinations of heat resistance indicated that the spores of this strain had a heat resistance greater than that of a number of other species, including *B. cereus*, *B. mycoides*, *B. mesentericus*, and several unidentified soil spore formers.

The heat resistance of the spores of *Bacillus subtilis* has not been extensively studied. Such observations as have been found in the liter-

ature are given in table 1, in which is also included observations which have been made in the course of this study on three strains of *B. subtilis*.

A determination of the minimum, maximum, and optimum reactions for growth gave the following results: growth was not obtained below  $P_H$  4.6 nor above  $P_H$  9.2. The optimum range was found to be from  $P_H$  7.4 to  $P_H$  8.2. All recovery medium and all medium for the production of spores, unless otherwise noted, were adjusted to  $P_H$  7.4 to  $P_H$  7.6. The optimum temperature of incubation was found to be 37 C.

Ratio counts of spore to vegetative cells made at daily intervals from stained smears revealed the fact that when cultivated in 1% peptone

TABLE 1.—RESULTS OF VARIOUS INVESTIGATORS ON HEAT RESISTANCE OF SPORES OF *B. SUBTILIS*

Time, Minutes	Tempera- ture, C.	Author	Year	Remarks
60	100	Brefeld <sup>9</sup> .....	1881	(b) dry spores heated with mixture of steam and air
15	105			
10	107			
5	110			
(a) > 30	110	Gruber <sup>40</sup> .....	1888	
(b) >150	100			
240	99.7 to 100.1	Miquel and Lattraye <sup>46</sup> ....	1895	
60	102.9 to 104.7			
30	102.8 to 106.3			
15	104.4 to 108.3			
175-180	100	Blau <sup>7</sup> .....	1905	
<30	101.5	Bullock <sup>12</sup> .....	1913	
3	100	Barlett and Kinne <sup>5</sup> .....	1914	
75	100	Ford and associates <sup>36</sup> ....	1916	
15 (?)	(19 lb.)			
<60	100	Koser and Mills <sup>48</sup> .....	1925	
(a) 36	95	Results in this paper.....	1928	(b) 2 strains 15 minutes
(b) 14, 15	100			

water under optimum conditions about 90% of the cells were in the spore form after ten days incubation.

*The Method.*—In order that results obtained in any one heat resistance determination may be comparable to the results obtained in other determinations, it is essential that the conditions under which the cells are exposed to heat be reproducible. Heating in the medium in which the cells have been produced is not satisfactory. The difficulty may be due to possible variations in the number of cells per unit of volume, variations in the hydrogen ion concentration of different lots of even the same medium, variations in the salt content of the medium, or in the content of organic material. Any one of these factors is reasonably certain to influence to a lesser or greater degree the thermal resistance of the organism being tested. In order to eliminate these factors it is necessary to concentrate the cells, wash free from adhering traces of the medium in which produced, and resuspend in definite numbers in a liquid which is little affected by heating to the

temperature to be used. The ampule in which the spore suspension is to be heated should be of hard glass, since soft glass may yield sufficient alkali to change the reaction of the menstruum (Esty and Cathcart<sup>29</sup>). These ampules should be of uniform bore and wall thickness in order that the lag period be equalized. The spore suspension should be strained or filtered in order to free from clumps.

The early methods employed for the study of the thermal resistance of bacteria are almost universally open to criticism. Determinations were made in the Arnold sterilizer, the autoclave, or when it was desired to heat at a temperature slightly in excess of 100 C., in a water bath to which calcium chloride had been added. The spore suspension, which usually consisted of a small quantity of the culture, was in some cases heated in sealed capillary tubes; in other cases, in large tubes, either open or closed, with little regard for the lag period necessary to obtain the desired temperature or for the time of the cooling after heating.

Bigelow and Esty<sup>6</sup> did much to remedy this situation by the introduction of a method which has been the basis of most of the heat resistance studies made in recent years. The chief improvements embodied in their work consisted in accurate temperature control and a more satisfactory method of preparing and handling the bacterial suspension than had been employed by other investigators. This method has been subsequently modified by Esty and Williams.<sup>31</sup>

Magoon<sup>60</sup> has recently employed capillary tubes of Pyrex glass for a determination of the heat resistance of washed spore suspensions. This method, which shortens to a minimum the period of lag necessary for the attainment of temperature equilibrium, has much to recommend it. Capillary tubes can be quickly prepared with a great economy in glass and are readily filled and prepared for heating. This method was given a thorough trial in the present study, but due to the high percentage of contaminations was abandoned. The results of one run may be cited as an illustration. Of 72 inoculated tubes, 61 showed contamination. In spite of the fact that all possible precautions were observed numerous other runs gave essentially the same percentage of contaminations.

The method selected, which gave results that could readily be duplicated, was a modification of that described by Esty and Williams,<sup>31</sup> the modification consisting in the use of a 5-tube test at close intervals, rather than the use of a larger number of tubes heated for one or few intervals. The exact procedure employed is given in detail in the following paragraphs. The spores were generally produced in a liquid medium, using the saturated sand substrat method of cultivation introduced by Magoon.<sup>60</sup> The sand used was sea sand which had been sieved to a uniform size, heated in dilute hydrochloric acid, neutralized with dilute sodium hydroxide, repeatedly washed with tap water followed by distilled water, and finally roasted. It was free from silt and settled rapidly out of suspension.

The standard time of incubation selected was ten days. It might be mentioned, however, that determinations made on cultures incubated for a period of from 12 to 15 days gave the same resistance as did 10-day cultures. The ripe spores and the sand were transferred to a sterile,



wide-mouth, glass-stoppered bottle with a large excess of sterile tap water. Vigorous shaking of the suspension served to break up the clumps of cells. The spores were washed three times with sterile water, sedimentation being effected by centrifugalization at high speed. Final suspension was made in a  $m/15$  phosphate buffer solution of a  $P_H$  of approximately 7.0. This suspension was filtered through a sterile pad of gauze-covered absorbent cotton, standardized by counting in a Helber Chamber and diluted so as to contain 50 million spores per ml.

The suspension was heated in Pyrex tubes of 1 mm. wall thickness, 7 mm. inside diameter, and about 10 cm. length. These tubes were washed with acid cleaning mixture, tap water, and distilled water, dried, wrapped in paper, and sterilized before use. The spore suspension was distributed by means of a 10 ml. graduated pipet in one ml. amounts in these tubes, which were immediately sealed in the oxygen flame. As quickly as possible the sealed tubes were placed in hangers so that they could be readily immersed in and removed from the bath, and were exposed to heat. A temperature of 95 C. was maintained in a De Khotinsky electric oil bath equipped with a motor-driven turbine stirrer and automatic temperature control. Boiling water, which varied between 99.5 C. and 100 C. was employed for the temperature of 100 C. The slight variation of less than 0.5 C. in the temperature of the water was not found to affect the endpoint.

At intervals of either one or two minutes, tubes in groups of five were removed from the bath and chilled immediately. At the completion of a run, the tubes were nicked by means of a motor-driven aloxite wheel. They were opened by snapping off the end of the tube in a steel bar heated by a Bunsen burner. This bar, which was designed by A. C. Richardson while a member of the staff of the Hooper Foundation, is illustrated in figure 1. It was mounted in an inoculating hood, and under this hood all transferring was done. The recovery medium, which was plain extract broth prepared according to standard method,<sup>3</sup> was inoculated by pouring the heated suspension into the tube of medium. The usual precaution of flaming the mouths of the tubes was observed. Exact data on contaminations were not recorded but it is certain that the percentage was extremely low, probably much less than 1%.

Incubation was at 37 C. and observations were made at daily intervals for the first week; then at weekly intervals until the tubes were finally discarded. The period of observation was in no case less than seven days, and with about one-half of the tubes it was extended to 60 days.

Following the procedure given above, the results have been recorded in terms of the last tube showing growth and not in terms of percentage of sterile tubes. In view of the work of Esty and Williams,<sup>31</sup> this method was probably not absolutely accurate, but it was possible to duplicate repeatedly the end-point of various runs. Hence it is felt that no serious error was introduced. The results as given are, with few exceptions, based on at least two determinations on different lots of spores, and in some instances on as many as five determinations.

#### BASIC RESISTANCE

The basic resistance of the organism used was established for two temperatures, 95 and 100 C. Since the values obtained serve as the points of reference for all other determinations, it is necessary that a definition be given. By basic resistance is meant the survival time of

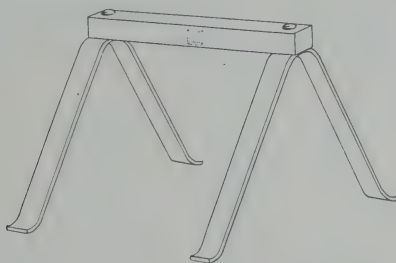


Fig. 1.—The bar used in opening the ampules; note the dotted opening for insertion of ampule.

50,000,000 washed spores from a 10-day old culture produced in a 1% solution of Parke-Davis peptone of a reaction of  $P_H$  7.6, and suspended in m/15 phosphate mixture of a reaction of  $P_H$  7.0 (colorimetrically determined) when heated to the temperature indicated. In determining these values, absolutely uniform procedure has been adhered to throughout. For determinations at 95 C. the temperature of the bath was raised two degrees and two minutes allowed to elapse before taking time. At the end of this lag period the temperature of the bath was ordinarily back to 95 C. At 100 C. an arbitrarily chosen lag period of one minute was allowed.

The results on a comparatively large number of determinations have been reasonably uniform. Slight variations between different batches of spores are to be expected, since any method of standardizing is subject to the possibility of some error with resulting differences in density of suspensions and consequent differences in heat resistance (Bigelow and

Esty; <sup>6</sup> Weiss,<sup>86</sup> and Esty and Meyer <sup>30</sup>). Furthermore slight variations in the temperature are inevitable when working at temperatures other than the boiling point of the liquid in which the heating is carried on. While such variations can be controlled quite closely, it is not unlikely that fluctuations, even though of brief duration, may sometimes affect the endpoint obtained. For these reasons, the basic resistance as given is the value which is most frequently obtained. Deviations of as much as 10% from these basic resistances have been encountered. Differences in resistance of spores of the same strain grown in different lots of the same medium have been observed (Esty and Meyer <sup>30</sup>), but no serious difficulty in this respect in the present study was encountered.

The basic resistance of the organism used was as follows: at 95 C., 35 minutes (range 34 to 38 minutes); at 100 C., 14 minutes (range 13 to 14 minutes). It was arbitrarily decided that any variation from the value most frequently observed must be at least as great as 15% in order to be considered as significant. This provision allows a sufficient margin of safety to care for slight and unavoidable errors in technique and temperature fluctuations.

#### INFLUENCE OF THE KIND OF MEDIUM ON THE THERMAL RESISTANCE OF SPORES

*The Kind of Peptone.*—As previously stated, the basic medium selected for this study was a 1% solution of Parke-Davis peptone. Since there are numerous brands of peptone available, and in view of the fact that bacteriological culture mediums may vary in their value for certain purposes depending on the kind of peptone used, it was felt that a comparison should be made of the resistance of spores produced in mediums prepared from several of the different brands of peptone.

The brands of peptone compared in this study were as follows: Parke, Davis and Co., Difco, Difco-proteose, Farchild, Armour, Jensen, Witte and Berna. All were used in 1% concentration. The results are shown in table 2.

As will be shown in a succeeding section, it has been found that phosphate materially influences the heat resistance of bacterial spores. In order to correlate, if possible, the heat resistance of the spores produced with the phosphate content, the eight brands of peptone were analyzed for this radicle. These analyses were made in the laboratory of the bureau of industrial chemistry of the University of Texas through the courtesy of E. P. Schoch, director of the laboratory, to whom thanks are due for his cooperation. The results are shown in table 2.

Obviously, the phosphate concentration was not the sole governing factor. Armour peptone contained the highest percentage of phosphate, yet the lowest resistance was exhibited by spores produced in this peptone. Berna peptone, with the least amount of phosphate, yielded spores of a resistance equal to those produced in Parke-Davis peptone which contained over thirteen times as much phosphate. The results of Wagner, Meyer and Dozier<sup>81</sup> do not lend support to the idea that the state of the nitrogen is a governing factor. These workers found Fairchild peptone to be proteose-free, yet the spores produced in solutions of this peptone are equal in resistance to those produced in the proteose-rich-Difco product.

*Concentration of the Peptone.*—Since the kind of peptone was found to be of some significance, it might be suspected that the concentration

TABLE 2.—THE PHOSPHATE CONTENT OF VARIOUS BRANDS OF PEPTONE AND EFFECT ON HEAT RESISTANCE OF SPORES OF *B. SUBTILIS*

Peptone	% Phosphate as P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>	Equivalent Molal Concentration of Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> in 1% Peptone Solution	Survival Time in Minutes			
			At 95 C.		At 100 C.	
			Lived	Died	Lived	Died
Parke-Davis.....	1.07	0.0015	35	36	14	15
Difco.....	0.17	0.0002	36	37	14	16
Difco-proteose.....	0.81	0.0011	49	50	18	20
Fairchild.....	0.67	0.0009	—	—	18	20
Armour.....	1.18	0.0017	—	—	12	14
Jensen.....	0.89	0.0012	—	—	20	22
Witte.....	0.10	0.0001	38	39	14	16
Berna.....	0.08	0.0001	41	42	14	16

of any one peptone might likewise be an important factor. Assuming for the sake of simplicity that a single component in a peptone might be a determining factor in the resistance of the spore produced, and the resistance within limits to be conditioned on the concentration of this particular component, then a change in the strength of the medium could very readily give a different survival time for the spores.

To test this hypothesis, the resistance of spores produced in Parke-Davis peptone water of four concentrations was determined. The per cent of peptone and the results obtained were as follows:

Peptone, %.....	0.5	1.0	2.0	5.0
Minutes survival at 85 C. ....	39	35	37	36

In none of the experiments included in this tabulation was the variation as great as 15%. Hence, no importance is attached to the variations noted.

The extent of growth in these various mediums is quite different. As might be expected, the richer the medium the greater the number of



cells, both vegetative and spore, produced. Counts of spores and vegetative cells revealed the fact, however, that the ratio of spores to vegetative cells was much greater in the poorer medium. This fact has direct bearing on the question of the physiology of sporulation as related to the resistance of the spore produced—a phase of the problem which will be considered in a later section.

The results obtained from these experiments are in general confirmatory of the work of Stephanidis,<sup>75</sup> who found no significant difference in the resistance of anthracis spores produced in mediums of different biologic value. The results also speak against the hypothesis that resistance, within limits, is governed by the concentration of any one, or even more than one, component of the peptone.

*Resistance from Digest Mediums.*—Peptic and tryptic digests of various protein materials have been used by bacteriologists for a variety

TABLE 3.—RESISTANCE OF SPORES PRODUCED IN VARIOUS DIGEST MEDIUMS

Medium	Survival Time in Minutes			
	At 95 C.		At 100 C.	
	Lived	Died	Lived	Died
Peptic digest.....	29	30	9	10
Tryptic digest of peptic digest.....	30	31		
Blood digest.....	32	33	10	12
Casein digest.....	41	42	16	18

of purposes. Such mediums have not, however, been very widely used for the cultivation of bacteria for resistance tests. The uses and value of digest mediums have been adequately discussed by Stickel and Meyer<sup>76</sup> and need not receive further treatment here.

Four digest mediums were used in this study: peptic digest prepared according to the directions of Stickel and Meyer;<sup>76</sup> peptic digest subjected to tryptic digestion for four days; blood digest, also prepared according to the directions of Stickel and Meyer; and casein digest prepared according to the method of Kristensen, Lester and Jürgens.<sup>49</sup> The results obtained are given in table 3.

The differences observed do not appear to be governed by the degree of digestion of the protein. In view of the fact that casein is a phosphoprotein, and hence would give a medium richer in phosphorus than is the case with the peptic digest, which is, according to Wagner, Meyer, and Dozier,<sup>81</sup> very poor in phosphorus, and since the phosphate radicle has been found to be of great importance—it seemed highly probable that the enhanced resistance in this case was in part due to the phosphorous content of the medium.

In order to secure further evidence on this point, blood clot digest medium was enriched by the addition of disodium phosphate in sufficient quantity to make the finished product one-tenth of a mole in this salt. Spores produced in this medium survived 14 minutes' boiling. It was found (table 4) that spores produced in Parke-Davis peptone water containing added phosphate exhibited a resistance of twenty minutes. In the case of the blood digest medium, as with the peptone solutions, the phosphate concentration does not appear to have been the sole limiting factor in the resistance of the spores produced, although it was unquestionably of some importance.

*Miscellaneous Culture Mediums.*—The resistance of spores produced in various nutrient mediums has been tested. The mediums used and results obtained were as follows:

Medium	Minutes at 95 C.	
	Lived	Died
Extract broth .....	37	38
Infusion broth .....	30	31
Huntton's hormone broth.....	32	33
Aminoids 1% .....	38	39

It is believed that in the cases of the infusion and hormone mediums, as with the digest mediums yielding spores of low resistance, the most probable cause of the low resistance exhibited is to be sought in a paucity of phosphate. Concrete evidence on this point is not, however, available and this view can be advanced only as an opinion. Aminoids is a commercial protein digest rich in amino acids. The nature of the protein digested to form the product used is not known.

*Effect of Gelatin on Resistance.*—The results obtained with spores grown in gelatin have been considered as of sufficient interest to justify treatment in a separate section. The first datum was obtained on spores grown in a 1% solution of isoelectric gelatin. The reaction of this solution ( $P_H$  4.7) was right at the acid limit of growth; hence the yield of spores was very meager, due to sparse growth of the organism. The resistance of such spores was found to be very high—54 minutes at 95 C. and 20 minutes at 100 C. The possibility that the spores were coated with a thin film of gelatin which was not removed by washing, and that such a condition might be responsible for the enhanced survival time was considered worthy of experimental investigation. Accordingly, washed spores which had been produced in peptone water were suspended in a 1% solution of isoelectric gelatin and held at icebox temperature for approximately 24 hours. They were again washed three times with sterile water and suspended in phosphate solution. Such spores in

a concentration of 50 million per ml. survived boiling only 14 minutes—the same length of time as the control run. Subsequent determinations of the resistance of spores produced in a 1% solution of ordinary gelatin, in peptone water containing 1% ordinary gelatin, and in peptone water containing 1% isoelectric gelatin indicate that the enhanced resistance noted in the first case was not due to the gelatin per se, since in all of these cases the resistance was normal, that is, 14 minutes at 100 C. These results are summed up in the tabulation based on determinations made at 100 C.

Medium	Minutes at 100 C.	
	Lived	Died
Isoelectric gelatin 1%.....	20	22
Peptone water, spores held in 1% isoelectric gelatin for 24 hours, then washed.....	14	16
Ordinary gelatin 1%.....	14	16
Peptone water plus isoelectric gelatin 1%.....	14	16
Peptone water plus ordinary gelatin 1%.....	14	16

The explanation of these results, it is felt, rests on the low ash content of isoelectric gelatin. Aronstein<sup>8</sup> found that the higher the salt content of a heat coagulable protein the more easily it could be coagulated. Cultivation of an organism in a medium which is practically ash-free obviously must result in the formation of a cell which has an extremely low salt content. Reasoning by analogy, the protein of such a cell would resist heat coagulation for a longer period of time than would a cell with a normal salt content. Unfortunately, this theory is not readily attacked experimentally, due to the low solubility of most proteins at the isoelectric point, and the difficulty of preparing ash-free products.

*Resistance from Vegetable Infusions.*—Vegetable infusions have not been commonly employed as culture mediums for bacteria, either alone or in combination with other ingredients, although observations made during this study indicate that they will support as luxuriant a growth as do the more commonly used animal protein mediums.

Seven vegetable extract mediums have been used in the present study for the production of spores. Spinach, bean, pea and corn mediums consisted of the juice from cans of these foods strained through gauze and sterilized by autoclaving. Asparagus and potato infusions were prepared by passing 500 grams of the fresh food through a food chopper. The juice which was pressed out was collected and added to the solid material together with 1000 ml. of distilled water. This mixture was infused over night in the ice chest, then boiled for a few minutes, strained, and sterilized under pressure. For the hay infusion, dry

alfalfa was used instead of fresh material. Otherwise the procedure was the same as that given above. In no case was the reaction adjusted. The survival times of spores produced in these mediums are as follows:

Medium	Minutes at 95 C.	
	Lived	Died
Spinach .....	48	49
Bean juice .....	48	49
Pea juice .....	46	47
Corn juice .....	42	43
Asparagus infusion .....	46	47
Hay infusion .....	42	43
Potato infusion .....	54	55

The resistance from potato infusion is particularly striking in view of the resistance from spores grown in the presence of starch, dextrin, and glucose, as discussed in a succeeding section. The results clearly indicate that such vegetable extractives as were tested yield spores of an enhanced resistance. This fact emphasizes the limitations of the applicability of heat resistance studies to the problem of the complete sterilization of canned foods. A time-temperature relationship evolved as a result of studies on spores produced on most of the mediums used by bacteriologists would require a greater margin of safety than would be the case were the study based on spores produced on vegetable infusion mediums. Naturally, other species of bacteria might possibly react differently than *B. subtilis*. This difference is, however, as likely to be in favor of a still more resistant spore as to be in favor of a decreased resistance.

*Resistance from Liquid and Solid Mediums.*—A comparison of the resistance of spores produced in liquid mediums with the resistance of spores from solid mediums was made in order to determine whether or not the ability of the cell to survive high temperature was affected by this factor. In all tests the liquid and solid mediums compared were from the same lot, the sole difference being the addition of 2% granulated agar to one portion. The various mediums used and the results obtained were as follows:

Medium	Minutes at 100 C.			
	Liquid		Solid	
	Lived	Died	Lived	Died
Peptic digest .....	9	10	9	10
1% peptone water (Parke-Davis) .....	14	15	12	14
1% peptone water (Parke-Davis) 0.1 m $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ .....	20	22	16	18
1% peptone water (Parke-Davis) glucose 1% .....	22	24	20	22
1% proteose peptone .....	18	20	16	18

With the exception of peptic digest medium, it appears that there was a slight difference in resistance between spores from liquid and



solid mediums, the spores from the liquids being slightly more resistant. These results are not in accord with those of Eisenberg<sup>25</sup> on vegetative cells of *B. anthracis*. The explanation of this worker postulated on differences in aeration in broth and on agar would not seem to be applicable in the case of *B. subtilis* even in the absence of the results recorded above. It is not likely that there is any appreciable difference in aeration of the cells on the surface of an agar slant and those included in the pellicle on the surface of a liquid medium.

TABLE 4.—EFFECT OF VARIOUS INORGANIC SALTS IN THE NUTRIENT MEDIUM ON THE HEAT RESISTANCE OF THE SPORES OF *B. SUBTILIS*  
SPORES HEATED IN PHOSPHATE BUFFER SOLUTION IN ALL CASES

Cation	Anion	Molal Concentration of Salt	Survival Time in Minutes			
			95 C.		100 C.	
			Lived	Died	Lived	Died
Na	Cl	0.1, 0.3, 0.5	37	38		
K	Cl	0.1, 0.5, 1.0	35	36		
Ca	Cl	0.5, 0.1, 0.2	40	41		
Mg	Cl	0.05, 0.1, 0.3, 0.4	45	46		
Fe (ic)	Cl	0.001, 0.01	40	41		
Na	SO <sub>4</sub>	0.1, 0.3	37	38		
K	SO <sub>4</sub>	0.5	36	37		
Mg	SO <sub>4</sub>	0.05, 0.1, 0.2	48	49	20	22
NH <sub>4</sub>	SO <sub>4</sub>	0.1, 0.5	35	36		
Na	HPO <sub>4</sub>	0.1, 0.3, 0.5	48	49	20	22
K	HPO <sub>4</sub>	0.1	45	46		
{Na	HPO <sub>4</sub> }	{0.15 molal				
{K	H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> }	{Ratio of Na to K <sub>2</sub>	44	45		
K	NO <sub>3</sub>		38	39		

#### INFLUENCE OF VARIOUS INORGANIC AND ORGANIC RADICLES ON THERMAL RESISTANCE

##### INORGANIC SUBSTANCES

*Single Salts.*—A careful search has been made through a vast amount of literature on the inorganic salt metabolism of bacteria for information relative to the effects of various elements and ions on the thermal resistance of bacteria, with no success. The influence of various salts on bacterial sporulation has been rather extensively studied. Numerous articles have been published bearing on the effect of inorganic salts on various physiological processes, but these have no significance in connection with the present study and need not be considered in detail here. An exhaustive review of the general subject of the effect of inorganic salts on bacteria, covering the literature up to 1923, has been published by Falk.<sup>32</sup>

Table 4 shows the results obtained with the various ions tested for their effect on the heat resistance of *subtilis* spores. The salts were

added in the concentrations indicated to a 1% solution of Parke-Davis peptone. The resulting medium was sterilized under pressure and inoculated without adjustment of reaction. Satisfactory growth was obtained in all cases.

An examination of this table reveals several very interesting facts. Attention may be directed first to the fact that changes induced in the heat resistance of the spores were dependent on the kind of ion present and not on the quantity of any one ion within the limits tested. That is, the salt effect was qualitative and not quantitative. Where the effect produced was due to the cation, the anion was of little or no significance; and conversely where the effect was due to the anion, the cation appears likewise to have been of little significance. Very slight increases in resistance were noted in the cases of iron and calcium. Material increases were shown as a result of growth in the presence of magnesium and phosphate salts. With all other salts where deviations from the basic resistance have been recorded, the variations were too slight to be considered as noteworthy. The observations on both magnesium and phosphate have been repeatedly confirmed, both at 95 and 100 C. The reason for the effects of these ions on thermal resistance is not apparent. It does not appear to be either a function of atomic weight or of valence.

At this point, attention may be called to the very interesting work of Merrill and Clark<sup>65</sup> on the production of gelatinase by proteus bacteria in synthetic mediums. In this case, where the important ions have been shown to be calcium and magnesium, it was found that a very small amount of the ion was sufficient to permit of the production of the enzyme. "Fair" production of gelatinase was recorded for a medium containing calcium chloride in amounts equivalent to as little as 0.0025%  $\text{CaCO}_3$ . With regard to magnesium they state ". . . the strength of the enzyme was the same in those cultures containing 0.0024% magnesium sulfate as in those of 0.05% magnesium salt content." It is especially noteworthy that the magnesium ion should be found to play such an important part in two diverse physiological processes; one, the production of gelatinase in synthetic medium by a nonsporulating organism; the other, the production of spores of an enhanced thermal resistance in a complex medium. Results which serve further to emphasize the importance of this element in the physiology of bacteria are to be found in the studies of Braun,<sup>8</sup> who has shown that the tubercle bacillus will not grow in the absence of magnesium. In another section of this report observations are recorded which show that the macroscopic appearance and physical character of the growth of *B. subtilis* in synthetic mediums is influenced by the presence of magnesium in the culture. Magnesium is obviously an element of considerable importance in the physiology of bacteria.

The phosphate radicle likewise has been shown to be of some significance in certain processes involving bacterial activity. The availability of organic acid radicles, as measured by the deposition of ferric hydroxide from iron salts of organic acids, is largely conditioned by the presence of phosphate (Lewis<sup>66</sup>). In

fact, the rapidity of utilization of the carbon complex can serve in a rough way as a biological assay for small amounts of phosphate.

*Balanced Salt Solutions.*—The formation of ammonia by *B. subtilis* in peptone water containing varying concentrations of the chlorides of sodium, potassium, magnesium and calcium, both singly and in combination, has been the subject of investigation by Lipman.<sup>56, 57</sup> Certain mixtures of these salts were found to be more favorable than were other combinations tested, this fact being interpreted to mean that the favorable solutions were more nearly physiologically "balanced" with regard to toxic and antagonistic action of the ions concerned. Magnesium chloride, for example, although less toxic than calcium chloride was found to restrain to some extent the production of ammonia even when present in a concentration as low as 0.1 mole. This toxic action could be decreased or antagonized by the addition of a suitable concentration of sodium chloride.

In view of the decided influence of magnesium, both as the chloride and as the sulfate, on the heat resistance of *subtilis* spores it was felt that determinations should be made of the resistance of spores produced in "balanced" solutions. The combinations of salts found most favorable by Lipman were used. These were prepared as follows. Stock solutions of each salt in 0.35 molal concentration were prepared. These were mixed in the various combinations and proportions shown in the table below, the volume in each case being reduced to 100 ml. by pipetting off the excess solution. A 1-gram portion of peptone was added to each flask; the solution was sterilized under pressure and inoculated without adjustment of reaction. Satisfactory growth was obtained in each case. Spore suspensions were prepared and tested as usual. The results of this series of experiments are tabulated.

Ml. of 0.35 M Salt Solution	Minutes Survival at 95 C.
NaCl 100	
MgCl <sub>2</sub> 10 .....	44
NaCl 100	
KCl 5 .....	40
NaCl 50	
KCl 100 .....	41
KCl 100	
CaCl <sub>2</sub> 5 .....	39
NaCl 100	
MgCl <sub>2</sub> 10	
CaCl <sub>2</sub> 5 .....	43
NaCl 100	
KCl 10	
MgCl <sub>2</sub> 10	
CaCl <sub>2</sub> 2 .....	42

There appears to be some indication that slightly more resistant spores were produced in some of the balanced solutions than in solutions containing a single salt. For example the mixtures of sodium and potassium chlorides yielded spores more resistant than solutions of either salt alone. In those solutions containing magnesium chloride, however, no increase above that obtained with nutrient solutions containing this salt alone was obtained. If the resistance of the spore were an index of the physiological condition under which the spore was produced, then a change in these conditions should be reflected in a change in spore resis-

TABLE 5.—RESISTANCE OF SPORES FROM MEDIUMS ENRICHED BY VARIOUS ORGANIC SUBSTANCES

Substance	% Concentration	Survival Time in Minutes at 95 C.	
		Lived	Died
Carbohydrates			
Glucose.....	0.1, 0.5, 1.0	49 to 50 22 at 100 C.	51 24
Lactose.....	1.0	50	51
Dextrin.....	1.0	48	49
Starch.....	1.0	52	53
Agar.....	0.1	41	42
Glucoside			
Amygdalin.....	1.0	35	36
Amino acids			
Glycocoll.....	0.1	48	49
Glutamic acid.....	0.1	48	49
Cystin hydrochloride.....	0.1	48	49
Tyrosine hydrochloride.....	0.1	44	45
Asparagin (amide).....	0.1	46	47
Salts of organic acids			
Sodium formate.....	0.1	36	37
Sodium acetate.....	0.1	44	45
Sodium citrate.....	0.1	36	37
Ammonium oxalate.....	0.1	34	35
Ammonium lactate.....	0.1	34	35
Potassium tartrate.....	0.1	44	45

tance. The results are not sufficiently striking, however, to justify such a conclusion.

#### ORGANIC SUBSTANCES

The influence of a number of miscellaneous organic substances on the thermal resistance of spores produced in their presence has been determined. The substance tested, the concentration added to the medium and the results which were obtained are shown in table 5.

Determinations of the ability of the organism to utilize the various compounds have not been made in all cases. Of the carbohydrates all except agar are fermented. Inasmuch as the agar employed was a commercial product the slight increase noted was probably due to impurities. The results in this series indicate that here, as with the proteins, the degree of digestion is of little or no significance, since



essentially the same resistance is manifested in the cases of starch, dextrin and glucose. The increased resistance obtained in the case of these substances correlated with the resistance obtained in the case of spores produced in potato infusion suggests that at least one factor responsible for the increase noted with spores from vegetable infusions was the presence of available carbohydrates. Both growth and spore yield was especially luxuriant with all of these carbohydrates.

Growth was extremely meager in the presence of amygdalin. The resistance of the spores produced was, however, normal. All of the amino acids gave an enhanced resistance. Of these compounds only asparagin has been tested for its availability. This compound supports a luxuriant growth when serving as the sole source of carbon and nitrogen. The cause of the enhanced resistance obtained with the acetate radicle is not clear. This substance was not metabolized by the strain of *B. subtilis* employed in this study, when tested in serial transplants. The availability of formate, lactate and tartrate has not been tested. Citrate and oxalate were not utilized in synthetic mediums.

#### HEAT RESISTANCE OF SPORES IN RELATION TO THE PHYSIOLOGY OF SPORE FORMATION

*The Extent of Growth and of Sporulation.*—Relative difference in the yield of spores on different mediums can be detected by the methods of preparing and standardizing spore suspensions which was employed in this study. Quantitative differences are less readily determined. It has been observed that cultures grown in mediums of relatively high salt concentration contain many clumps which cannot be broken up into a uniform suspension. This condition is probably a manifestation of salt agglutination. Quantitative determinations of the yield of spores in any medium should be accompanied by a determination of the total number of cells per unit volume of the nutrient solution, since a knowledge of the extent of growth is of as great significance as is the spore yield. Heating an aliquot of the culture sufficiently to destroy vegetative cells will probably destroy a number of the spores as well, and since only this method affords any information as to the number of spores and vegetative cells when plate counts are employed, it was decided to apply the direct microscopic method of counting to the cultures. The phenomenon of clumps in high salt medium speaks also against the plate count method, as does the well known tendency of *B. subtilis* to spread on the moist surface of agar plates. Direct microscopic counts are not possible with all mediums since in some cases the clumps are so large as

to preclude any possibility of even an approximation of the number of cells included. It is felt, however, that this method was more reliable than plate counts would have been under the conditions affecting this study.

The results obtained in this phase of the work do not support a belief that either favorable or adverse cultural conditions per se are a determining factor in the resistance of the spores produced. Extremely resistant spores were produced under cultural conditions which permitted of very meager growth (isoelectric gelatin) while under equally or more adverse cultural conditions, the spores produced were of normal resistance (peptone water plus bile or amygdalin). Similarly under conditions which permit luxuriant growth, spores of high resistance (glucose-peptone water) of normal resistance (5% peptone water) or

TABLE 6.—EXTENT OF GROWTH, SPORE FORMATION AND HEAT RESISTANCE WITH DIFFERENT MEDIUMS

Medium	Cells per ml. $\times 10^6$			Resistance Minutes Survival		Ratio; Spore to Vegetative Cell
	Spores	Vegetative	Total	95 C.	100 C.	
1% peptone (Parke-Davis).....	952	497	1,449	35	14	1.935
5% peptone (Parke-Davis).....	1,915	7,127	9,042	36	..	0.268
1% aminoacids.....	2,434	1,905	4,339	38	..	1.277
0.1 M NaCl 1% peptone.....	4,868	438	5,306	37	..	11.114
Peptic digest.....	1,682	6,466	8,148	29	9	0.250
Blood digest.....	1,503	4,656	6,159	32	10	0.323

No correlation is apparent between heat resistance and either extent of growth or degree of sporulation. An extension of this table would merely serve further to emphasize this point.

of low resistance (peptic or blood digest medium) were produced. In general the results indicate that there was little or no relationship between the physiologic factors influencing sporulation and the heat resistance of the spore. This belief is supported by the figures based on direct microscopic counts of 10-day old cultures (table 6).

*Effect of the  $P_H$ .*—It has been suggested by Esty<sup>28</sup> that the reaction of the medium used for the cultivation of organisms for thermal resistance tests may be a factor of primary importance in the resistance of the cells produced. So far as can be determined, only a small quantity of data bearing on this point is given in the literature on heat resistance. Esty and Meyer<sup>30</sup> noted differences in the survival times of spores of *Cl. botulinum* produced in different flasks of the same medium, similarly inoculated and incubated. They state that "these differences appear to be independent of the final reaction of the culture fluid within the range of  $P_H$  6 to 8. . . ." Other workers in this field have not commented on the resistance of spores from mediums of different reactions.

It would appear that this point is of some significance in connection with the relation of the physiology of sporulation to the thermal resistance of the spore produced. Numerous workers using various test organisms have demonstrated that the luxuriance of growth is conditioned by the reaction of the medium, other factors being equal. Itano and Neill<sup>45</sup> have established that the hydrogen ion concentration of the medium exerts a marked influence on the spore cycle of *B. subtilis*, both in relation to spore germination and to the rapidity of spore formation.

In view of the statements given above, it was felt that direct data should be accumulated on the thermal resistance of spores produced in mediums of different initial reactions. In this connection the work of Itano<sup>44</sup> is of interest. This investigator observed that the final reactions of culture fluids in which *B. subtilis* had been grown was essentially the same, regardless of the initial reaction. Attempts have been made to buffer various culture solutions so as to maintain a constant reaction, with no success. The buffer index (Brown<sup>30</sup>) of a 1% solution of Parke-Davis peptone with an initial reaction of  $P_H$  7.87 was found to be 2.65 over the range  $P_H$  4.6 to 9.2. After *B. subtilis* had grown in this medium for ten days the reaction was  $P_H$  8.72. The addition of primary and secondary phosphates in such amounts as to give a 0.1 molal concentration of phosphate in the medium resulted in a buffer index of 20.5. The initial reaction in this case was  $P_H$  7.60. The final reaction after ten days growth of *B. subtilis* was  $P_H$  8.75. The attainment of this reaction was little influenced by the presence of phosphate, the reaction of both the buffered and the unbuffered solutions being practically the same by the second day of incubation ( $P_H$  8.25 and 8.41 respectively). Other attempts to stabilize the reaction likewise met with failure; hence no buffer substances were added to the culture solutions.

Mediums of three reactions were used: one ( $P_H$  5.4), below the optimum range for growth; another ( $P_H$  7.4), within the optimum range; and a third ( $P_H$  8.4), above the optimum range. The resistance of spores produced in these mediums is shown in the tabulation.

Initial $P_H$ of medium.....	5.4	7.4	8.4
Minutes survival at 95 C. ....	34	34	36

These results clearly show that, so far as this organism is concerned, the reaction of the medium in which the spores were produced was without influence on their heat resistance.

*Effect of the Temperature at Which Grown.*—It seems strange that while a vast amount of work has been done on the heat resistance of bacteria little attention appears to have been given to a factor which can very readily be shown to be of vast importance. This factor is the temperature of incubation of the culture. The usual procedure appears to have been to make resistance tests on organisms grown at the optimum temperature of the species concerned.

So far as can be determined, only two investigators have made comparative tests on the effect of the temperature of incubation on the

thermal resistance of bacteria. Weil,<sup>84</sup> in a study of the physiology of sporulation of *B. anthracis* tested the resistance of the spores produced at various temperatures of incubation to the lethal effects of a temperature of 90 C. His results are somewhat irregular as is shown by the following figures taken from his paper:

Temperature of incubation.....	37	31	24	18
Resistance: minutes at 90 C. ....	12	9	10	7

From these results no conclusion is justified other than that the heat resistance of the spore is decreased by cultivation at temperatures below the optimum, since the decrease observed was irregular.

Sames,<sup>72</sup> in a study of thermophilic organisms, compared the heat resistance of the spores produced at 37 C. with the resistance of those produced at 56 to 62 C. His technique which consisted in drying the spores on cover glasses, exposing to steam and planting in nutrient agar,

TABLE 7.—EFFECT OF TEMPERATURE OF INCUBATION ON HEAT RESISTANCE

Medium	Temperature of Incubation	Survival Time in Minutes			
		At 95 C.		At 100 C.	
		Lived	Died	Lived	Died
1% peptone water	Room temperature 21 to 23 C.	22	23	10	11
	23	30	31		
	37 (optimum)	35	36	14	16
	41			16	18
1% peptone water plus glucose 1%	Room temperature 21 to 23 C.			12	14
	37			20	22

is subject to criticism, but his results are in accord with those of Weil. The lower temperature of incubation gave spores of lower thermal resistance.

In this study, determinations have been made of the heat resistance of spores of high resistance and of normal resistance produced at various temperatures of incubation. The results are given in table 7.

The results here reported, considered in connection with those of Weil<sup>84</sup> and of Sames,<sup>72</sup> justify the conclusion that the higher the temperature of incubation the more heat resistant the spores produced. It is not unlikely that this fact explains in part some of the discordant results which have been obtained by various workers on thermal resistance, but it is hardly sufficient to harmonize such vast differences in resistance of the spores of *Cl. botulinum* as exist between the results of Van Ermengen<sup>26</sup> and those of the late workers on this problem.

*Cultivation at Reduced Surface Tension.*—The effect of bile on the surface tension of liquids is too well known to require discussion.



Although bile is far from inert in its action on bacteria, it was decided to employ this substance as the agent to reduce the surface tension of the medium in order that the effect of cultivation under such a condition on heat resistance might be determined. Any departure from the normal naturally would have necessitated the use of other agents so as to exclude the possibility that the induced change had been due to the constituents of the bile.

The medium used was 1% peptone water with Difco desiccated bile added in a concentration of 0.5%. In this medium, growth was very meager. This result is in accord with the well known growth inhibiting action of bile on bacteria. The spores produced under such conditions were, however, normal in their heat resistance, surviving 14 minutes of heating at 100 C.

One naturally cannot overlook the possibility that a number of factors may be operative in such a culture medium, some of which may tend to enhance the resistance, while others tend to decrease it. The sum total of such factors, if they do exist, however, results in a normal heat resistance.

#### EFFECT OF VARIOUS FACTORS ON RESISTANCE

*Effect of Numbers.*—Numerous investigators have observed that it is more difficult to effect sterilization of a dense suspension of bacterial cells than a dilute suspension. In view of this fact it was not considered necessary to make an exhaustive study of the effect of numbers on the survival times of the organism employed in this study. A quantitative determination of the number of survivors at various time intervals is discussed in another section of this paper, the results of this experiment being directly applicable in this connection. In addition, survival times of suspensions of various densities, as determined by Helber chamber count, were established. The results are also shown graphically in figure 2.

Millions of spores per ml. ....	100	75	50	25	1	0.1
Survival time (minutes) at 100 C. ....	19	16	14	12	8	6

These results clearly indicate that the organism used in this study reacted similarly to other organisms which have been employed in thermal resistance determinations. The greater the number of cells per unit volume exposed to heat, the longer will be the period of time necessary to effect destruction, other factors being equal.

*Time-Temperature Relationship.*—It has long been recognized that a very definite relationship exists between the time necessary to destroy any given suspension and the temperature to which the suspension is exposed. Bigelow and Esty<sup>9</sup> studied this relation for a series of 19 thermophilic organisms and observed that the destruction curve, i. e., the graph of temperature plotted against time, for any one strain was approximately parallel to the destruction curve of any other strain although the survival time at the various temperatures used might be markedly different. In view of this definite time-temperature relationship, they

have introduced and used the term "thermal death point in relation to time" or "thermal death time," in preference to the older term "thermal death point."

The survival times of the strain of *B. subtilis* used in this study, at the temperatures of 95, 100 and 105 C. are 35, 14, and 6 minutes respectively (fig. 3). These results are based on suspensions containing 50 million spores per ml. These results afford further confirmation, if such be needed, that the length of time necessary to destroy a suspension of a given density decreases as the temperature increases.

*Effect of Heating in a Solution of Increased Density.*—In order to determine whether or not a slight increase in the density of the suspending menstruum would affect the end point of a determination, spores were exposed in phosphate mixture to which glucose had been added in sufficient quantity to make the concentration of this substance one mole. Glucose was selected in preference to either inorganic or organic salts because of its ready solubility, its extremely low ionization, and hence the absence of any possible toxic effect of the ions such as has been noted by Esty and Meyer<sup>30</sup> for the sodium ion.

The control experiment was carried out simultaneously with the test experiment using spores from the same original lot. Broth to which had been added

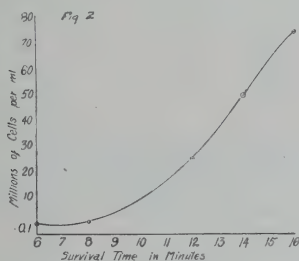


Figure 2

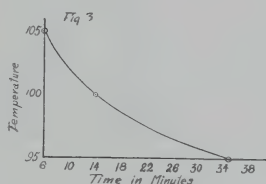


Figure 3

Fig. 2.—The effect of numbers on the heat resistance of spores in *B. subtilis*.

Fig. 3.—The effect of temperature on the heat resistance of spores of *B. subtilis*.

one ml. of one molal glucose solution was employed as the recovery medium for the control in order to equalize the cultural conditions.

No difference in resistance as a result of heating in the solution of increased density was observed, the spores in each case surviving 14 minutes exposure. Little is known about osmotic changes in spores, but obviously any changes which might have taken place were not sufficient to affect the resistance of the spores tested.

*Effect of Length of Tube in Which Heated.*—Where the pyrex tubes in which the spore suspension is heated are used more than once each successive determination naturally employs a tube shorter than was the case in the preceding test. Since a small amount of air is driven out of the tube during the process of sealing the suspension is actually tested under a slight vacuum. The difference in the amount of air driven out of long and short tubes is not great, but in view of the fact that Tanner and McCrea<sup>79</sup> observed that a reduced air pressure favored the survival of *Cl. botulinum* spores it was felt that a comparison of the resistance of spores heated in long and short tubes should be made. Accordingly aliquots of the same spore suspension were distributed in two lots of tubes, one lot consisting

of tubes of about 7 to 9 cm. in length, the other of tubes about 12 to 14 cm. in length. These tubes were heated simultaneously. No difference was found between the resistance exhibited in each case, from which it may be concluded that the length of the tube in which the suspensions were exposed was not a factor in the thermal resistance of *B. subtilis* spores.

*Effect of X-Ray.*—The recent work on the effect of radiation of the fruit fly with X-rays on the rate of mutation has attracted considerable attention and has stimulated a great amount of research along this line. It has generally been held that X-rays exert little or no effect on bacteria (Zinsser). No one appears to have determined whether or not radiation influences the heat resistance of bacterial spores produced from radiated cells. Through the courtesy of J. T. Patterson of the department of zoology of the University of Texas, it was possible to radiate a culture and test this point. The conditions of the experiment were as follows: The culture in broth was exposed for 12½ minutes at a distance of 17 cm. to a dosage of ten milliamperes at 50,000 volts. This culture along with a untreated control was incubated for 10 days at 37 C. Spore suspensions were prepared and the resistance to a temperature of 100 C. determined by the usual

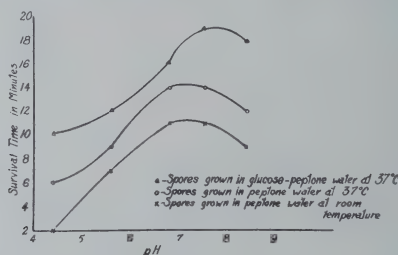


Fig. 4.—The effect of  $P_H$  on the heat resistance of spores of *B. subtilis*.

method. The resistance of both control and radiated culture was the same—14 minutes.

The dosage in this case was what, from the geneticist's standpoint, is considered moderate. No change appears to have been produced in the culture either in appearance of the growth, or in vigor.

*Effect of  $P_H$  of the Suspending Menstruum.*—In the course of the work here reported, determinations have been made of the survival time of spores of varying "normal" resistance when heated at varying  $P_H$  values. The suspending fluid in each case was 15th molar phosphate solution, the reaction being adjusted by altering the concentrations of the primary and secondary salts. The  $P_H$  value was checked electrometrically, and is given to the nearest tenth. The spores employed in these tests were produced under the following conditions: 1% peptone water incubated at room temperature; 1% peptone water incubated at 37 C.; 1% peptone water with 1% glucose added, incubated at 37 C. The results tabulated and illustrated in figure 4.

Spores from	$P_H$	Minutes Survival at 100 C.				
		4.4	5.6	6.8	7.6	8.4
1% peptone water at room temperature.....	2	7	11	11	11	9
1% peptone water at 37 C. ....	6	9	14	14	14	12
1% peptone water plus glucose 1% at 37 C.....	10	12	16	16	20	18

The value obtained for the spores produced in glucose medium and heated at  $P_H$  6.8 was slightly lower than would be predicted from the results in the other two cases. It will be noted that the maximum resistance in each case was near the neutral point. This observation is, in general, confirmatory of the work of previous investigators of the same subject. Hence, *B. subtilis* spores react to the toxic action of both the hydrogen and the hydroxyl ion similarly to other species of bacteria.

*Effect of Desiccation.*—Certain workers, notably Arloing, Cornevin and Thomas,<sup>2</sup> Gruber,<sup>40</sup> Kronig and Paul<sup>50</sup> and Dunham,<sup>28</sup> have reported results which indicate that spores which have been subjected to desiccation for varying periods of time exhibit a greater resistance than did the original suspension. On the other hand, the results of Weil<sup>85</sup> with aerobic spores (*B. anthracis*) and of Esty and Meyer<sup>30</sup> with anaerobic spores (*Cl. botulinum*) are not in harmony with the work of the investigators mentioned above, they having observed a decrease in resistance as a result of desiccation. Von Wahl<sup>82</sup> failed to find any appreciable difference in the resistance of the spores of *B. daucorum* as a result of storage over  $CaCl_2$  at 40 C. Magoon<sup>60</sup> has studied the combined effect of desiccation and temperature on spore resistance. His results may be summarized briefly as fol-

TABLE 8—EFFECT OF DESICCATION ON HEAT RESISTANCE

Spores from	Plate Counts and Minutes Survival at 100 C. 50 Million Cells per ml. by Heiber Count					
	Initial—Moist			Dried for 60 Days		
	Time		Plate Count	Time		Plate Count
	Lived	Died		Lived	Died	
1% peptone water at room temperature.....	11	13	41 million	12	14	17 million
1% peptone water at 37 C. ....	14	16	40 million	15	17	15 million
1% peptone water with 1% glucose at 37 C. ...	16	18	40 million	16	18	41 million

lows: in a cold, dry environment there was practically no change in resistance during the first 30 days. After 60 days there was a slight increase which remained practically constant for the duration of the experiment (180 days). In a dry atmosphere at a moderate temperature there was an increase in resistance, followed by a decrease, this in turn being followed by an increase. In a warm, dry atmosphere there was an increase in resistance followed by a slow decrease. No explanation of these changes was suggested.

The question of the effect of dehydration on the thermal resistance of spores appeared to be open for further experimentation. The results which have been obtained, although not exhaustive, are of some interest.

The exact procedure employed was as follows: spore suspensions were prepared as usual and divided into two portions, one of which was standardized and exposed to a temperature of 100 C., employing the customary method, in order to establish the initial resistance of the spores. The second portion was distributed over sterile sand in a petri dish and placed over the dehydrating agent in a desiccator. Comparative tests showed phosphorous pentoxide to be a much more efficient dehydrating agent than either sulphuric acid or calcium chloride; hence it was the agent used. Esty and Meyer<sup>30</sup> found that the method of drying, whether over sulphuric acid, calcium chloride or phosphorous pentoxide, was of no significance. The spores were held in the dry state at room temperature for about 60 days before further tests were made. Three lots of spores have been tested, the conditions under which they were produced being indicated in table 8.



At the beginning of this experiment the possibility suggested itself that the decrease in resistance which had been observed by Esty and Meyer<sup>30</sup> as a result of drying might be due to a decrease in the number of viable cells in the suspension. Dehydration might be expected to cause the death of a part of the cells and since the spores were from an anaerobic organism, long continued exposure to aerobic conditions might have a toxic effect. Where suspensions are standardized by turbidity measurements, or by Helber chamber count, nonviable cells are not taken into account. Hence the suspensions heated might actually have contained fewer viable cells than did the initial suspension. In order to shed some light on this point, plate counts were made of the suspensions employed in the tests. It should be remembered that these suspensions were all standardized by counting in the Helber cell and diluted so as to contain 50 million spores per ml. The counts obtained, based on five plates of a one to one million dilution of the suspension, are shown in the third and fifth columns of the table.

The spores produced in glucose peptone water exhibited an atypically low resistance at the outset. Such behavior has not been manifest with any other lot of spores produced in a glucose medium, although some ten or twelve runs on such spores have been made. The plate counts indicate that these spores resisted

TABLE 9.—EFFECT OF AGE OF THE SPORE ON HEAT RESISTANCE

Spores from	Minutes Survival at 100 C. and Plate Counts on Young and Old Spore Suspensions 50 Million cells per ml. by Helber Count					
	Initial—Moist			Stored Moist for 60 Days		
	Minutes		Plate Count of Suspension	Minutes		Plate Count of Suspension
	Lived	Died		Lived	Died	
1% peptone water at room temperature.....	11	13	41 million	6	8	25 million
1% peptone water at 37 C. ....	14	16	40 million	10	12	17 million
1% peptone water with 1% glucose at 37 C. ....	16	18	40 million	12	14	30 million

the lethal effects of dessication more effectively than did the other spores tested. In the case of the spores produced in plain peptone water at incubator temperature the resistance was slightly greater than would be expected with fresh moist spores. Figure 2 shows that a suspension of 15 million spores should survive for about ten or eleven minutes. By analogy a similar decrease can be assumed to exist in the case of the spores produced at room temperature. The results as a whole indicate that dehydration of *B. subtilis* spores resulted in a slight increase in thermal resistance.

*Effect of Age of the Spore.*—In connection with the determination of the effect of desiccation on spore resistance, the factor of the age of the cell must be considered. Evidence has been accumulated on this point in the present study. At the same time that spores were placed over a dehydrating agent, a portion of the same suspension was stored at room temperature in phosphate solution. Determinations of the resistance of these spores were made at the same time as the resistance of the dry spores. Plate counts of the suspensions were also made. The results obtained are shown in table 9.

Considered in connection with the results obtained with dried spores, this table is especially interesting. Dry spores manifested slight increases in resistance as a result of dehydration, while spores from the same lot stored for exactly the same length of time in a moist condition exhibited essentially the resistance which would be predicted for suspensions of young spores of a corresponding concentration of viable cells. These results are at variance with those reported by Magoon,<sup>60</sup> who

found that spores of *B. mycoides* stored in a moist condition at a moderate temperature increased markedly in resistance within 60 days. Species differences may account for the divergent results, but further work is necessary before a definite statement to this effect can be made. From the results here reported, it is clearly evident that age alone is not the sole governing factor in the resistance of old spores. The conditions under which the spores have been allowed to age, and the concentration of viable cells in the suspensions tested must be considered in establishing an accurate survival time for old spores.

*Clumps in Suspension and Failure of Heat Inhibition.*—Not infrequently in heat resistance determinations there have occurred what have been designated as "skips." By this expression is meant growth from a tube heated a longer period of time than other tubes which failed to exhibit growth. Such skips usually occur near the critical point of the organisms concerned. An examination of the results of Globig<sup>30</sup> and of Levy and Bruns<sup>32</sup> reveals the occurrence of skips in the work of these investigators. They have also been encountered by Esty and Meyer,<sup>30</sup> Dickson and associates,<sup>22</sup> Esty and Williams,<sup>31</sup> and others. The explanation of this phenomenon, according to Esty and Williams, rests not on errors in technique, but on the variable resistance of individual cells and the chance distribution of more resistant cells which must obviously therefore be present in small numbers. This explanation is based on results obtained by heating a comparatively large number of tubes to each time-interval and observing the percentage of tubes which fail to give growth.

Hastings, Fred and Carroll<sup>43</sup> contend that if a suspension be thoroughly shaken so as to produce a uniform emulsion, irregular results will not occur. In this connection, it will be recalled that Esty and Meyer<sup>30</sup> noted that the number of skips was decreased by employing a carefully strained uniform emulsion and also by prolonged incubation. Esty<sup>28</sup> has justly questioned the contention of Hastings, Fred and Carroll that one million cells should certainly contain individuals exhibiting all grades of resistance. Even with suspensions much denser than one million cells per unit of volume occasional variations will occur which can be explained on no other basis than the chance distribution of cells of either increased resistance or, in some cases, decreased resistance. Such variations may be encountered in spite of the utmost care in all details of the experimental procedure. In the present study they have not been frequent enough to occasion serious trouble, but the fact that they do occur speaks against basing a positive statement on the results of too few determinations.

That clumps exert a profound influence on the results of determinations of resistance of bacteria, both to disinfectants and to heat, is a well established fact. Both Geppert<sup>38</sup> and Gruber<sup>41</sup> spoke of clumps in suspensions to be used in evaluating disinfectants as a source of error and emphasized the necessity of filtering the suspension. Harrison and Hood<sup>42</sup> noted that the thermal death time of organisms in suspensions containing clumps was several times higher than was the case when the same suspension was filtered through filter paper. They ascribe the fact to a protection of the central spores in the clumps. Newton<sup>68</sup> has presented significant evidence bearing on this problem. She found that quite irregular results were obtained if unfiltered suspensions were used for heat resistance determinations, although the results were constant when similar suspensions were filtered. Filtration was more effective in removing the clumps than was centrifugization. She expressed the opinion that the high thermal resistance of spores reported by Ford and his co-workers<sup>36</sup> was due to the presence of clumps in the material tested. Esty and Williams<sup>31</sup> found that the mode of filtration, whether through paper or sterile sand, was of no significance.

In the work herewith reported no difficulty was encountered due to the occurrence of skips. The first observation on a series of tubes might show skips, but these were in practically every case filled out within two or three days at the most. That there is a difference in the resistance of the individual spores which would have resulted in skips, had a 1-tube test been used, is quite certain. A sharp endpoint in the sense that all tubes are positive at one interval and all negative at later intervals was never obtained provided the intervals were spaced sufficiently close together. Usually there was a gradual and regular decline in the number of positive tubes. Under such conditions it is obvious that skips will occasionally occur if a single tube test be used.

Although it could be considered as sufficiently well established that clumps in a suspension will cause an erroneous end-point,\* it was thought worth while to accumulate some further evidence on this point. Filtration here as with all other suspensions was through sterile gauze and cotton pads. Two determinations only have been made. One was made on spores grown in peptic digest medium, the other on spores grown in 1% Parke-Davis peptone water. The density of the filtered and unfiltered suspensions as determined by Helber count was as nearly equal as possible. The unfiltered lot probably contained more cells per unit volume than the filtered due to the fact that no correction could be

TABLE 10.—RESULTS OF EXPERIMENTS ON FILTERED AND UNFILTERED SUSPENSIONS

Medium in Which Produced		Resistance in Minutes at 100 C.									
		Filtered					Unfiltered				
		Lived		Died			Lived		Died		
Peptic digest broth .....		9		10				120		135	
Peptone water .....		14		16				50		60	
Minutes exposed.....	10	12	14	16	18	20	30	40	50	60	70
Number of tubes showing growth											
Filtered .....	5	4	1	0	0	—	—	0	1	—	—
Unfiltered .....	5	—	—	—	—	1	3	0	—	0	—

5 tubes tested at each interval, — indicates no test.

made for cells in clumps. The difference, however, could not have been very great. The temperature of heating was 100 C. The results are shown in table 10. The irregularity of the results is illustrated in the following table tabulations in which the germination record of the filtered and unfiltered suspension of spores from 1% peptone water is given.

Similar results were obtained with the spores from peptic digest broth. The findings embodied in the last two tabulations are especially interesting. If unstrained suspensions only had been tested it would not only appear that the spores from peptic digest broth were more than twice as resistant as those from peptone water but also that they were more than 13 times as resistant as was actually found to be the case by testing a uniform emulsion. In processes which involve the destruction of bacteria as they occur under natural conditions the maximum resistance which may be exhibited by clumps is obviously of great significance. For comparative studies on thermal death time, however, it must be emphasized that homogeneous suspensions are essential.

A simple statement that the central spores of a clump are protected does not suffice to explain why they are protected. The temperature of the clump certainly cannot be less than that of the isolated cell so why should the resistance

\* During the progress of this work and subsequent to the completion of the experiments given above, there appeared the very interesting papers of Robertson<sup>70</sup> on thermal resistance of non-spore-forming bacteria occurring in milk. This worker unfortunately appears to have overlooked the factor of cell aggregates.

of the cells composing the clump be so much greater than that of individual cells when all conditions other than the degree of dispersion are the same? The most reasonable answer to this question would appear to be founded on the difference in resistance to dry heat and to moist heat. It seems probable that the spore or spores enclosed in the center of a clump are in a more or less insulated condition and are protected from the ready ingress of the solution in which suspended. They are therefore really subjected to dry heat instead of moist heat. Such an assumption appears to be supported by experimental evidence since either filtration or prolonged shaking (Hastings, Fred and Carroll<sup>43</sup>), which probably served to break up the clumps and produce a homogeneous emulsion, gives more uniform results, thus indicating that the individual cells composing the clump are not unusually resistant. It is not an unreasonable assumption to make that prolonged exposure to moisture in a nutrient medium would serve to soften a firm clump to such an extent that viable spores would be released and consequently initiate growth.

#### DORMANCY

Although it is only in quite recent years that the problem of dormancy, or delayed germination, has engaged the attention of bacteriologists, the fact has long been known that bacterial cells under favorable growth conditions may fail to initiate growth within the ordinary period of observation (24 to 48 hours). Brefeld<sup>9</sup> early called attention to delayed germination in the following words:

Die durch längeres Kochen geschwächten Keime zeigen, ebenso wie die Sporen, die man lange aufbewahrt hat, eine langsamere Auskeimung, die oft nachträglich noch eintritt wenn man die Culturen lange genug stehen lässt.

Numerous other workers have also observed the phenomenon of retarded germination with various organisms. Dormancy in *B. anthracis* spores has been noted by Geppert,<sup>38</sup> Süpfle<sup>78</sup> and Dengler;<sup>20</sup> in unidentified spore formers by Eckelmann;<sup>24</sup> in *Escherichia coli* and spores of *B. subtilis* and *B. megatherium* by V. Burke, Sprague and Barnes;<sup>15</sup> in anaerobic spores, chiefly *Cl. botulinum*, by G. S. Burke,<sup>13</sup> Northrup,<sup>69</sup> Weiss,<sup>86</sup> Dickson and associates,<sup>21, 22</sup> Esty and Meyer<sup>30</sup> and in various anaerobic spore formers by Barber.<sup>4</sup> Apparently the heated spores of thermophilic organisms do not exhibit dormancy since it was not observed by Bigelow and Esty,<sup>6</sup> Esty and Williams<sup>31</sup> or Feirer.<sup>34</sup>

The early explanation of the cause of dormancy postulated an attenuation of growth vigor as a result of injury due to heat or chemicals. This hypothesis is, however, refuted by the work of Barber,<sup>6</sup> G. S. Burke,<sup>22b</sup> V. Burke, Sprague and Barnes,<sup>15</sup> and McCoy and Hastings,<sup>58</sup> all of these investigators having reported delayed germination in cells which had not been exposed to heat or chemicals.

In order to determine whether or not heat injury might be a factor in either prolonging or shortening the time necessary for visible growth to appear in tubes



of medium inoculated with one or at most very few spores of *B. subtilis* a series of tubes of nutrient medium was inoculated from an unheated suspension in accordance with the following method: a suspension of washed and strained spores (from a 10-day broth culture) was made in sterile tap water. This suspension was standardized by Helber chamber count and diluted with sterile water so as to contain one spore in 2 ml. Using a shielded delivery tube attached to a sterile 50 ml. buret, the top of which was kept covered by an inverted sterile beaker during all operations, this dilute spore suspension was distributed in tubes containing 2 ml. of double strength extract broth. A series of plain milk tubes was also inoculated, the quantity of medium in this case being such that the factor of dilution was minimized. These tubes were incubated at the optimum temperature of the strain used (37 C.) and observed daily for the first week. Thereafter, they were examined at approximately weekly intervals until the medium had evaporated to such an extent that further readings were not practicable. The tubes were discarded on the 53rd day. Readings were based on the formation of the typical surface growth of *B. subtilis* in broth, and on proteolysis in milk.

The percentage of positive tubes (62 for milk and 55.55 for broth) was lower than that obtained by G. S. Burke<sup>13b</sup> for botulinum (89%). This fact may be explained on the basis of an error in standardization, resulting in fewer organisms per unit volume than was expected, a higher percentage of dead cells in

TABLE 11.—DORMANCY IN UNHEATED SPORES

Medium	Number of Tubes Inoculated	Number of Tubes Showing Growth and Day on Which Growth Appeared												
		(Day)	1	2	3	4	5	6	7	15	23	34	41	48 53
Plain milk .....	100		0	0	39	22	1	0	0	0	0	0	0	0
Extract broth .....	900		156	312	31	1	0	0	0	0	0	0	0	0

the suspension than one would suspect, or a combination of these two factors. The rapidity with which tubes can be inoculated by the method used will scarcely permit of an assumption that the distribution of spores within the buret was so unequal as to give this low percentage of positives. Under the most favorable circumstances possible, a certain number of sterile tubes will inevitably result, provided the dilution is accurate, since the method of standardization does not take into account the presence of nonviable cells in the suspension, although unquestionably some of the cells present are incapable of initiating growth. Furthermore, it cannot be doubted that some few unit portions of the dilution as distributed will contain two or three viable cells while others will contain none. Naturally, no conclusions can be drawn from tubes which remain sterile.

The results of this experiment do not confirm the findings of Burke, Sprague and Barnes.<sup>15</sup> Little is known concerning strain differences or similarities except in the case of *Cl. botulinum*, and possibly the thermophilic group, and in these instances only when heated spores are considered, hence the observed discrepancy in results loses in significance. The fact that uniformity of findings is lacking emphasizes, however, the necessity of further work in this field.

The observations which have been made on delayed growth in broth tubes inoculated with heated spore suspensions are as follows: tubes

observed, 7243; tubes showing growth, 3442; time of appearance of growth as tabulated.

Day of growth appearance.....	1	2	3	4	5	6	7	8	12	30	34	66
Number of tubes....	1435	1639	173	53	19	12	3	2	1	1	1	1
%.....	41.69%	49.07%	5.02%	1.54%	0.55%	0.35%	.087%	.058%	.029%	.029%	.029%	.029%

The tabulation includes only the tubes which were closely observed over a sufficiently long period of time to afford conclusive data. When it became apparent that growth later than the 5th to 6th day was unlikely to occur, regular observations were discontinued beyond the 7th day and no record was kept of the day on which growth appeared. A number of sets of tubes have been held for periods up to 30 days, but a detailed consideration of these would not alter the conclusions which can be drawn from the figures in the accompanying table.

Attention is called to the fact that out of 3,442 tubes which showed growth only four developed after the eighth day of incubation. All of these occurred in one run with spores which had been produced in 1% peptone water containing  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  in 0.1 molal concentration. In view of the conclusive work on the effect of clumps of cells on heat resistance, it appears to be a reasonable assumption that some factor which likewise might have been clumps due in this instance to an imperfect filter, was probably operative in this one isolated case. Other runs on spores from peptone water containing sodium phosphate failed to exhibit any delay in germination.

It will be noted that the day on which the maximum number of tubes showed growth was the same as in the case of unheated spores. This fact would seem to indicate that heat injury is not a factor of great importance in retarding growth.

#### QUANTITATIVE DETERMINATION OF SURVIVORS AT VARIOUS TIME INTERVALS

The mechanism involved in the destruction of microorganisms under the influence of a lethal agent, either physical or chemical in nature, has been a subject of considerable controversy in the past. This general problem has recently been subjected to extensive study by Falk and Winslow<sup>33</sup> and need not be reviewed in detail here. From data on the mortality of *Es. coli* in solutions of  $\text{NaCl}$  and  $\text{CaCl}_2$  and in distilled water of varying  $P_H$ , these workers conclude that under some conditions the course of mortality may be roughly described by the equation for a chemical reaction of the first order. The relationship, however, is

neither exact nor close, since under other conditions the equation for a reaction of a higher order better describes the process. Hence the reaction between lethal agent and cell is probably highly complex and is variable with different conditions.

In order to establish the mortality curve for the organism used in this study, quantitative platings at various intervals of time were made. The test was run in triplicate and five plates of each dilution were made. The temperature employed was 95 C. Plating was done in extract agar of suitable reaction, using clay covered dishes in order to minimize spreading. Counts were made at the end of 24 hours and the results averaged. There was a very close agreement between plates, so that no wide deviations from the average are masked by this procedure. The counts are given in accordance with the table for the expression of results in the standard methods of the American Public Health Association.<sup>1</sup> The results are given in table 12 and shown graphically in figure 5.

As may be seen, the curve obtained by plotting the logarithm of the number of survivors at each time interval against elapsed time is not

TABLE 12.—DETERMINATION OF THE THERMAL DEATH RATE OF SPORES OF *B. SUBTILIS*

Time in Minutes	Number of Sur- vivors per ml.	Logarithm of Number of Survivors	Velocity Constant K
0	22,000,000	7.342	
5	13,500,000	7.130	0.097
10	8,500,000	6.544	0.183
20	190,000	5.278	0.237
25	22,000	4.342	0.276
30	150	2.176	0.396
35	8.6	0.934	0.183

a straight line. A calculation of the velocity constant (column 4 in the table) using the equation for a chemical reaction of the first order\* gives steadily increasing values for K up to the last constant calculated. From an inspection of the equation it is apparent that if K increased in value then the factor  $\log \frac{a}{a-x}$  must have increased in value faster than would be the case if K were constant, since the term  $\frac{1}{x}$  becomes progressively smaller with the passage of time. Since  $\log \frac{a}{a-x}$  can increase in value only as  $a-x$  decreases in value, then the reaction in this case must have progressed at a rate faster than would have been the case had it been monomolecular in nature. Obviously, therefore, the conditions under which this experiment was performed were not of such a nature as to give a course of mortality which can be described by the equation for a chemical reaction of the first order.

\*  $0.434 K = \frac{1}{t} \log \frac{a}{a-x}$  where  $a$  = the original number of viable bacteria,  $a-x$  = the number of viable bacteria after time  $t$ ,  $t$  = time in minutes,  $K$  = velocity constant, and logarithms are to the base 10.

ATTEMPTS TO INCREASE THE RESISTANCE TO HEAT BY SELECTION  
AND BY REPEATED CULTIVATION

Bigelow and Esty<sup>6</sup> record that one type of thermophilic organism was increased in resistance within six months by repeated artificial cultivation, so that the survival time at a temperature of 120 C. was increased from 12 to 23 minutes. The experimental conditions were not, however, stated in detail. By selection of the survivors of heat resistance runs, these workers were also able to produce a very resistant type. Magoon,<sup>61</sup> by a process of selection, has likewise been able to increase the heat resistance of *B. mycoides* very greatly.

Spontaneous change in heat resistance of a culture has also been noted by Magoon.<sup>61</sup> This phenomenon was not encountered in the present work. The culture used had been carried in stock some years, however, and it is probable that relative stability had been acquired.

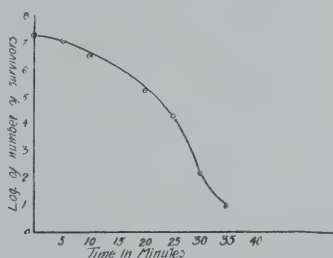


Fig. 5.—The death rate of spores of *B. subtilis* at 95 C.

In order to determine whether or not an increase in heat resistance in the case of *B. subtilis* could be demonstrated as a result of the selection of the progeny of more resistant spores, heat runs were made and subcultures for a repetition of the run were prepared from one of the tubes showing growth at the last positive interval. It was not intended at the outset to do more than establish whether or not the resistance of the culture was influenced by this process of selection; consequently, the results, although decisive, are not exhaustive. Determinations were made according to the procedure previously outlined, the heating being carried out at a temperature of 95 C.

From the first run, two tubes showed growth after heating for 38 minutes. Spores produced in the subculture from one of these tubes showed growth after 42 minutes of heating, this being the longest time exposed. Whether or not growth would have occurred after a longer period of heating naturally cannot be stated. From the 42-minute survivors, spores were produced which had a resistance of 54 minutes. An increase of 16 minutes (42%) was considered as sufficient evidence to indicate that, like *B. mycoides* and the thermophilic organisms, *B. subtilis* could be materially increased in resistance as a result of selection.

Further work was directed along the line of inducing a permanent increase in resistance as a result of cultivation in mediums which regularly yielded spores



of a resistance in excess of the normal. The mediums selected were as follows: 1% peptone water plus  $\text{MgSO}_4$  0.1 molal; 1% peptone water plus  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0.1 molal; 1% proteose peptone water. As a control, a parallel culture on 1% peptone water was carried. The cultures were transplanted 5 times at 5-day intervals in these mediums, after which a suspension of spores was prepared and subjected to a temperature of 100 C. in the usual manner. At the same time that the last inoculation was made the transplanted culture was also inoculated back into 1% peptone water in order to determine if any variation from the basic resistance had resulted.

The results from this series of experiments were uniformly negative. The special mediums enumerated above have invariably yielded spores of an enhanced resistance, but it was not possible to increase or to "implant" this resistance by continued cultivation in these mediums. The control cultures in all cases yielded spores of a normal survival time.

#### PRODUCTION OF SPORES IN SYNTHETIC MEDIUMS

Compared with certain other bacterial species, notably those of the colon-typhoid-dysentery group, there has been little work done on the nutritive requirements of *B. subtilis*. Frankel,<sup>37</sup> working along the same line as the recent studies of Braun<sup>8</sup> and his collaborators, that is, determining minimum growth requirements, cultivated *B. subtilis* in a much simpler solution than that employed by Uschinsky<sup>80</sup> for the cultivation of pathogens. Frankel's solution employed ammonium lactate and asparagin as the sources of carbon and nitrogen. Maassen<sup>59</sup> tested the ability of various organisms to utilize the salts of 21 organic acids as sources of carbon. His results indicated that *B. subtilis* could use five of these, namely, malic, fumaric, citric, formic and lactic, the availability of these being as listed for the first three, while both formic and lactic supported only a very meager growth. Fischer<sup>35</sup> states that only a very low concentration of mineral salt is necessary for bacteria, from 0.1 to 0.2% being sufficient. He gives the availability of various C and N compounds for *B. subtilis* in simple mediums and states that sugars are the best source of C followed by glycerol and other polybasic alcohols.

According to Fischer the C demands are less narrow than is the case with N. Organic compounds of N were not of themselves capable of supporting vigorous growth. Sullivan<sup>77</sup> stated that *B. subtilis* shows little power to develop on simple mediums. The work of Koser and Rettger<sup>47</sup> stands in agreement with this theory, these workers finding that aerobic spore formers develop rather scantily and slowly in amino acid mediums, growth being irregular and in some instances failing to appear. Koch<sup>46</sup> stated that K is essential to the development and activities of *B. subtilis*.

Much, if indeed not all, of the early work on the nutritive requirements of *B. subtilis*, as well as many other forms, needs repetition, since Braun<sup>8</sup> and his collaborators have shown that results which are not founded on growth in serial transplants are highly liable to error, and little of the early work was done in accordance with this requirement.

It was felt that the most logical approach to the problem of the effect of various complexes on the heat resistance of bacterial spores was through the medium of synthetic culture fluids. Such solutions are readily duplicated, and are subject to a wide range of varying composition. Accordingly considerable time was devoted to this line of attack.

Because of the fact that sporulation in all of the synthetic mediums tested was too meager to yield a sufficient number of spores for heat resistance determinations, this phase of the problem was not productive of results. It is felt, however, in view of the lack of information on sporulation in synthetic mediums that the results are worthy of consideration. It has been shown by several workers, particularly Sommer and Lipman,<sup>74</sup> that ordinary chemically pure chemicals may contain a quantity of impurity sufficient to be physiologically significant for higher plants. Since the salt requirements of bacteria are so low, such impurities are certain to be physiologically active provided they are qualitatively significant. Highly purified chemicals are, therefore, essential. The chemicals used were subjected to three recrystallizations, using conductivity water as the solvent. In the case of the phosphate salts, recrystallization was not possible; hence Merck's blue label salts (so called Sorensen salts) were used.

All glassware was thoroughly washed with acid-cleaning solution and rinsed, the final rinsing being with conductivity water. Shallow layers in small (50 ml.) Erlenmeyer flasks were used for the cultures. The salts were dissolved in conductivity water in fairly concentrated solutions and the nutrient fluid was prepared by mixing suitable aliquots of these. The inoculum was from a broth culture of the organism, which by repeated transplanting had been rendered spore-free upon microscopic examination. Serial transplants were made in all cases, the first two cultures being discarded, the third serving as the source of material for examination. Microscopic examinations of smears from the flasks showing growth were made at the end of 40 hours and again at 64 hours. At this latter interval of time 1% peptone water showed approximately 50% of the cells as spores. Qualitative determinations only were made on these smears from synthetic media, comparative counts not being made. The first medium tested was the most complex of the series. Asparagin was used as the source of both carbon and nitrogen. The amounts of the mono- and di-basic phosphates were so adjusted as to give a favorable reaction, thus avoiding the necessity of titrating. The values given in the following formula are in terms of percentage: asparagin, 0.4%;  $\text{FeCl}_3$ , 0.01%;  $\text{MgSO}_4$ , 0.02%;  $\text{CaCl}_2$ , 0.01%;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.16%; and  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 1.49%; reaction,  $\text{P}_H$  7.2 (colorimetrically).

In this medium, in which both the iron and the calcium precipitated, probably as phosphate, a luxuriant growth was obtained. A heavy pellicle formed within 24 hours. The growth was extremely mucoid and quite unlike the typical appearance of *B. subtilis* in ordinary organic mediums. After 40 hours of incubation, no spores were observed on examination of a stained preparation. The vegetative cells appeared as long slender rods, two or three times the normal length, highly curved, and twisted. After 64 hours of incubation, spores were fairly common, probably 10% of the cells being in the form of spores.

The second medium differed from the first in that an additional source of carbon was supplied in the form of glucose in 0.3% concentration. Macroscopically and microscopically, the culture was quite similar to that in the first medium, the only apparent difference being the much lower number of spores. After 64 hours of incubation only an occasional spore could be seen.

Medium 3 differed from medium 1 in that the iron salt was omitted. Glucose was added to this solution in 0.3% concentration to form medium 4. In these nutrient fluids the macroscopic appearance of the growth was similar to that of the first two solutions. Microscopically, the cells did not appear to be so highly distorted. Sporulation was very scanty in medium 3 at the end of 64 hours, and was wholly lacking in the case of medium 4.

For mediums 5 and 6, both the iron and calcium salts were omitted from medium 1. Medium 6 contained glucose in the same concentration as medium 2 and 4. Macroscopically and microscopically, the cultures were similar to those in mediums 3 and 4.

Mediums 7 and 8 were prepared by omitting the iron and magnesium salts from medium 1, and by adding 0.3% glucose to the latter of the two. In medium 7, macroscopic growth did not appear in the second transplant, nor were organisms apparent in microscopic examination. Transplants made to nutrient broth after 48 hours gave the typical growth of *B. subtilis*. Serial transplants from the glucose enriched medium grew very poorly. This growth was not in the form of a mucoid pellicle as was the case with the first six mediums but was diffused throughout the culture. Spores were not present after 40 hours and were rare after 64 hours of incubation.

To obtain mediums 9 and 10, medium 1 was simplified by the omission of the salts of iron, calcium and magnesium, glucose being added to medium 10 in the same concentration as in previous cases. Growth in these media was very sparse and diffuse throughout the medium. Only in the solution containing glucose were spores noted, these being extremely few in number and appearing only in the smear made after 64 hours.

Subsequent tests have established that in serial transplants the salts of oxalic, acetic and citric acids are not available as a source of carbon. In the presence of glucose the organism readily utilized ammonium salts as sources of nitrogen.

A very interesting observation made in connection with the series of cultures given above is that, although with one exception growth occurred, no pellicle was formed in the mediums which did not contain magnesium. Furthermore, in all cases where a pellicle was formed, it was not the "dry," tenacious type associated with *B. subtilis*, but was a thick mucoid type of growth, stringy to the touch.

Contrary to the statement of Fischer,<sup>35</sup> an organic compound of nitrogen, asparagin, was found to support a comparatively luxuriant growth of *B. subtilis* when serving as a source of both carbon and

nitrogen. The necessity of serial transplants, as emphasized by Braun<sup>8</sup> is apparent from the failure to confirm the report of Maassen<sup>59</sup> as to the availability of citrates.

#### CONFIRMATORY EXPERIMENTS

For confirmation with another species of some of the facts established for *B. subtilis*, a number of runs were made with *B. mycoides* as the test organism. Great difficulty was encountered in breaking up the clumps of cells so as to obtain a uniform emulsion in the case of this organism. Although the results obtained were in general in agreement with those obtained under similar conditions with *B. subtilis*, irregularities in the form of skips, were encountered. The occurrence of skips was interpreted as an indication of the probable presence of clumps in the suspension, and in view of the conclusive work on the effect of clumps on thermal death time determinations it was not felt that reliance could be justly placed in the results obtained. Accordingly experimental runs were made with several other species, including *B. anthracis*, *B. cereus*, and an aerobic spore former isolated in the research laboratory of the National Canners' Association at San Francisco from an underprocessed can of food. This organism has been identified as *B. vulgatus*. With all of these species, homogeneous emulsions could be easily prepared. In the cases of *B. anthracis* and *B. cereus*, however, the normal heat resistance was so low (3 minutes at 100 C.) that they were not considered satisfactory for use. With cells of such low resistance the lag period is of more significance than is the case with more resistant forms. Furthermore, contaminations are more likely to be encountered since the possibility exists that extraneous organisms may gain entrance to the spore suspension in spite of the utmost care in handling. In instances where contaminants have a resistance greater than that of the test organism, such a condition may result in an error in the interpretation of the results. This is particularly true where the type of growth of the contaminant is similar to that of the test organism. Even in cases where the types of growth of the forms concerned are unlike, the question of the inhibition of one species by another must be considered. *B. anthracis*, for example, is very sensitive to the metabolic products of other species (Lewis<sup>54</sup>).

The spores of the strain of *B. vulgatus* in a concentration of 50 million per ml. exhibited a resistance of 16 minutes at 100 C., the medium in this case having been a 1% solution of Parke-Davis peptone. Accordingly, determinations were made of the resistance of spores pro-



duced under some of the conditions which had been found to be of significance in the case of *B. subtilis*. The medium used and the results obtained are given in table 13. The results in similar medium obtained with *subtilis* spores are also shown.

A comparison of the results given in this table with those which have been obtained for *B. subtilis* shows that *B. vulgatus* responded to the cultural environment similarly to *subtilis*. The magnitude of the response does not parallel that of *B. subtilis* in all cases but the results are nevertheless in harmony. From this result it may be inferred that the findings recorded in this paper will be found to be of general applicability so far as aerobic sporulating organisms are concerned.

TABLE 13.—COMPARISON OF THERMAL RESISTANCE OF SPORES OF *B. VULGATUS* WITH SPORES OF *B. SUBTILIS*

Medium	Minutes Survival at 100 C.	
	<i>B. vulgatus</i>	<i>B. subtilis</i>
Peptone water 1% incubated at 37 C. ....	16	14
Peptone water plus glucose 1%.....	26	20
Casein digest .....	18	16
Peptone water plus $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 0.1 m. ....	22	20
Peptone water plus $\text{MgSO}_4$ 0.1 m. ....	24	20
Isoelectric gelatin 1%.....	20	20
Peptone water, incubated at 41 C. ....	22	16
Peptone water, incubated at room temperature.....	14	10

#### GENERAL DISCUSSION

##### THE CAUSE OF DEATH IN CELLS EXPOSED TO HIGH TEMPERATURE

The immediate cause of death when a cell is exposed to a temperature considerably in excess of the maximum temperature of growth is apparently due to the coagulation of certain cell constituents, protein in nature and probably albumin. Hellmich (quoted by Lewith<sup>55</sup>) isolated a heat coagulable albumin-like protein from a hay bacillus grown on synthetic medium. Nencke and Drymont<sup>67</sup> obtained also from anthrax protein a heat coagulable fraction. Levene<sup>51</sup> isolated from tubercle bacilli grown on synthetic media three proteins, all coagulable by heat. It is especially interesting that one of these fractions was coagulable at approximately the temperature necessary for the destruction of the organism—50 to 64 C.

Chick and Martin<sup>17</sup> state that denaturation of proteins precedes coagulation. Denaturation appears to proceed most rapidly in highly acid or alkaline solutions, a fact which, it seems, would serve to explain the lethal effect of the hydrogen and hydroxyl ions.

The idea that the cause of death is due to a heat coagulation of the bacterial protein finds support in the work of Lewith,<sup>55</sup> Cramer,<sup>19</sup> Chick<sup>18</sup> and Robertson.<sup>70b</sup> Conditions which render protein more difficult to coagulate result in an increased resistance of the cells exposed.

#### THE CAUSE OF HEAT RESISTANCE

Cramer<sup>19</sup> summarized the possible causes of resistance to heat by bacteria as follows: the protoplasm of the spore is different from that of the vegetative cell; the spore membrane acts as a protective structure; the low water content of the resistant cell is the responsible factor. To these causes there can now be added as a fourth possibility the low salt content of the cell protoplasm, and as a fifth, the nutritive conditions under which the spore was formed. Strictly speaking, the first four factors could all be treated under the fifth heading, since with bacteria the factor of prime importance in practically all of their manifestations of life processes is the nutritive environment. As a matter of convenience, however, these factors will be considered separately.

*Protoplasm of Spore and of Vegetative Cell.*—Zopf<sup>87</sup> suggested that the unusual resistance of bacterial spores at the boiling point of water was related to the spore contents. The spore and the vegetative cell must differ in composition. Cramer<sup>19</sup> however rejected this theory. Mellon,<sup>64</sup> in another connection, has found support for the view that the spore and the vegetative cell differ in composition in the early work of Růžicka<sup>71</sup> who reported that microchemically the spore gave the reactions of linin, which was held to be interchangeable with chromatin. If linin and chromatin are antigenically distinct then this view is substantiated by the work of Mellon and Anderson<sup>63</sup> who reported distinct antigenic differences between the spore and the vegetative cell of *B. subtilis*. Although the possibility that the spore differs in composition from the vegetative cell cannot be summarily dismissed, further evidence is desirable before such possibility can be accepted as proven. The treatment to which Mellon and Anderson subjected the spores before employing them as antigens might possibly have resulted in antigenic modifications which were reflected in the results obtained. However, even if a difference in composition does actually exist the possibility that such a condition would serve to explain the differences in thermal resistance of spores and vegetative cells appears to be remote.

*The Spore Membrane as a Protective Structure.*—Von Esmarch<sup>27</sup> suggested that spores surround themselves with a firm protective coating which hinders the penetration of heat. Lewith<sup>55</sup> considered the protec-

tive property of any covering which might exist as negligible. Cramer<sup>19</sup> stated that this possibility might be considered as likely if the increased resistance of the spore were exhibited only against chemicals. Since the lethal effects of high temperature are also resisted, this view is materially weakened. In the work embodied in this report evidence has been accumulated which appears to bear directly on this point. Spores produced in a medium containing the phosphate radicle in a suitable concentration exhibited an enhanced thermal resistance, although when produced under certain other conditions and heated in the presence of phosphate such an increased resistance was not manifested. This observation is interpreted to mean that the surface of the cell was not modified by the ion in such a way as to result in an increased survival time. Furthermore, cultivation in isoelectric gelatin resulted in spores of an increased resistance. Washing the spores in isoelectric gelatin failed to modify the resistance as did cultivation in ordinary gelatin in an equivalent concentration or in peptone water enriched by the addition of isoelectric gelatin.

Immediately following the death of the cell there is certainly a change in the permeability of the cell membrane. This is demonstrated by the staining reaction of Burke<sup>14</sup> who has shown that there is a close correlation between the increase in the number of cells which can be stained with basic fuchsin and the decrease in viable cells as a result of heating. This work, which was done with *Cl. botulinum* as the test organism, has been confirmed for a number of aerobic spore formers by Koser and Mills.<sup>48</sup> A consideration of the work of Chapman, Greenberg and Schmidt<sup>16</sup> suggests an explanation for this change in avidity for dye. These workers found that the capacity of a protein to combine with an acid dye could be correlated with the content of the free basic groups of arginine, lysine, and histidine. Margrethe and Sorenson<sup>62</sup> state that in denaturation it is highly probable that there is a true chemical change in the constitution or composition of the protein. It is therefore not unlikely that the denaturation of the cell proteins results in either an internal or surface change of such a nature that certain groups capable of combining with dyes are made available.

It is felt, however, that the cause of thermal resistance must be sought elsewhere than in the nature and structure of the spore coat.

*The Low Water Content of the Cell.*—Lewith<sup>55</sup> ascribed the cause of the heat resistance of bacterial spores to the low water content of the protein composing the cell. Earlier workers having established the fact that bacterial cells contain a heat coagulable protein, Lewith<sup>55</sup>

undertook to show the conditions under which the cell would resist heat coagulation. He determined experimentally that the temperature at which a protein coagulates is roughly inversely proportional to the water content. This point is illustrated by the following table from Lewith's paper, based on an exposure of 30 minutes.

Egg Albumen	Temperature of Coagulation, C.
Aqueous solution .....	56
With 25% water.....	74-80
With 18% water.....	80-90
With 6% water.....	145
Water-free .....	160-170

Cramer<sup>19</sup> concurred in this view of Lewith and added further evidence. He found that bacteria have no typical water or ash content but that these vary according to the conditions of growth. At a high temperature the water and ash content are decreased and on long standing of the culture they are increased. He also held that the water present was hygroscopic and consequently evaporated quickly in dry warm air, leaving a water-free protein which, therefore, would be more heat resistant. Robertson<sup>70b</sup> in his study of the heat resistance of non-spore-forming bacteria presents evidence which indicates that increased thermal resistance is due to a low moisture content.

Without doubt water plays a significant rôle in the destruction of bacteria by heat. The difference in resistance to dry and moist heat is well known. Numerous workers have shown that bacteria are more easily killed in aqueous solutions than in air. Furthermore, heating in non-aqueous fluids has been shown to be essentially the same as heating in dry air so far as the time required to effect sterilization is concerned. Dreyer and Walker in 1912 found that spores heated in glycerol or oil with superheated steam were killed no more rapidly than if heated in dry air at the same temperature for the same time. This work finds confirmation in the studies by Bullock<sup>12</sup> and Bartlett and Kinne.<sup>5</sup> The possibility suggests itself that the high resistance of botulinum spores in oil stratified broth, as compared with plain broth or brain medium which was reported by Dickson<sup>21</sup> was due to the fact that spores were "trapped" in the oil. In fact Dickson<sup>22</sup> has suggested this possibility and advanced evidence which strongly supports such a view.

So far as the present study is concerned little direct evidence on the effect of the water content of the cell on thermal resistance is available in the data which have been gathered. If the statement of Cramer<sup>19</sup> that a high temperature gives a protoplasm of low water and ash content be correct, then the observations on the temperature of incubation lend



support to the view that thermal resistance may be in part governed by the water content of the cell, since it was found that the higher the temperature of incubation the more resistant the spore produced. Likewise the statement of Cramer that the water and ash content of the cell is governed by the conditions of cultivation of the culture may be afforded support in the results obtained during the progress of this study, since it has been found that the cultural conditions under which the spore was produced exerted a marked influence on thermal resistance. It was hoped that the experiments on the desiccation of spores would shed some light on the rôle of the water content of the protoplasm in thermal resistance, but further work along this line is required before definite statements are justified.

*The Ash Content of the Cell.*—Aronstein<sup>3</sup> early established the fact that serum proteins of low ash content resisted heat coagulation and alcohol precipitation more effectively than did a protein of relatively high ash content. He stated: "Das reine albumin wird weder durch Siedhitze noch durch Alkohol coagulirt; die durch diese agentien bewirkte Gerinnung desselben ist durch den Salzgehalt seiner natürlichen Lösungen bedingt."

The following figures on the amount of coagulated albumen obtained from serums of various salt contents are from this paper:

100 cc. ordinary serum.....	6.521 gm.
100 cc. almost salt-free serum yielded after addition of	
0.030 gm. NaCl.....	2.423 gm.
0.080 gm. NaCl.....	3.831 gm.
0.160 gm. NaCl.....	4.662 gm.
0.802 gm. NaCl.....	4.859 gm.

Obviously the amount of protein which can be coagulated is conditioned by the amount of salt present in the solution. Weber<sup>83</sup> has also found that the coagulation of muscle proteins takes place more rapidly in the presence of salt than in salt poor solutions.

The results which have been obtained on spores grown in a medium of low ash content (isoelectric gelatin) lend support to the view that the cause of thermal resistance rests in part on a low salt content of the protoplasm of the cell. A discussion of the work of Cramer<sup>19</sup> on the effect of various factors on the ash content of the cell has been given in a preceding paragraph and need not be repeated here. Even in the absence of this work it would be obvious that cells produced in a medium practically or wholly free from salts must have an extremely low salt content or even be wholly free of ash. The latter condition is unlikely to be fulfilled, since small amounts of salts may dissolve out of the glass vessel in which the culture is grown. The high resistance of the cells grown in isoelectric gelatin, and the fact that this high resistance can be

explained on no other basis than the low ash content of the protoplasm speaks for the recognition of this factor as one of prime importance as a cause of increased thermal resistance.

*Nutritive Conditions Under Which the Cell Is Formed.*—The effect of nutritional factors on thermal resistance has been discussed in part in preceding pages and little remains to be added at this point. Bucholtz<sup>11</sup> hinted at the significance of the cultural environment in the following words: "Bakterien, denen andere Nahrstoffe das material zu ihrem Wachstum geliefert, mögen sich zu Antiseptica anders verhalten, mögen ihnen eine grössere oder geringere Resistenz entgegensetzen. . . ." Růžička<sup>71</sup> claimed that the sporoid bodies which were produced by *B. anthracis* on certain one-sided foods exhibited a lower resistance than did ordinary spores.

The importance of the cultural environment for the production of resistant spores is clearly apparent from the work embodied in the present report. The explanation of the facts observed, however, is not evident. Magnesium and phosphate are certainly two ions of great significance in the production of resistant spores. Of organic substances available carbohydrates, certain organic acid radicles and certain amino acids are likewise important. All vegetable infusions tested gave spores of enhanced resistance. It is difficult to harmonize the fact that resistant spores are produced in a glucose medium, for example, with the ash or water content of the spore. Likewise it is difficult to understand why two ions as little related as magnesium and phosphate should give the most resistant spores of all inorganic complexes tested, while calcium, which stands near magnesium in the periodic system, and which has been shown to be physiologically significant (Merrill and Clark<sup>65</sup>), should give spores of practically normal resistance.

Attempts to produce still more resistant spores by the addition of glucose to casein digest medium resulted in failure. It seems probable that there is a limit to the resistance which can be obtained for a given strain.

Subsequent studies may supply the explanation of the effects of the cultural environment on thermal resistance which is now lacking. At present the facts only can be advanced.

#### SUMMARY

This report deals chiefly with a study of the survival time of *B. subtilis* spores produced under a wide variety of nutritive and environmental conditions and exposed to high temperatures. The basic resistance has been defined as the resistance of a suspension of a definite density, pro-

duced and tested under certain standard conditions. The basic resistance of the strain employed was 6 minutes at 105 C., 14 minutes at 100 C. and 35 minutes at 95 C. Most of the determinations were made at 100 and 95 C.

Pronounced deviations from the basic resistance have been produced by changing the nutritive substratum. The kind of peptone used has been found to be significant, but the resistance appears to have been independent of the concentration of the peptone.

Spores of diminished resistance were formed in all digest mediums tested with the exception of casein digest, which yielded spores of an enhanced resistance. The explanation of this probably rests on the difference in phosphate content of these mediums.

Very resistant spores were formed in isoelectric gelatin. Evidence has been advanced to show that this was probably due to the low salt content of this medium.

Infusions of vegetable matter were found to be excellent mediums. Spores of high resistance were formed in these mediums in all cases. Slightly more resistant spores were formed in liquid than in solid mediums.

Cultivation in the presence of a suitable concentration of either phosphate or magnesium resulted in the formation of spores considerably more resistant than the normal spores. Spores slightly more resistant than normal were formed in the presence of calcium or iron, and also by cultivation in physiologically balanced solutions. The increase in these cases, however, was not pronounced. A number of inorganic salts were found to be without influence on the resistance of spores produced in mediums to which they had been added.

Mediums enriched by the addition of certain organic substances were found to yield spores greater in resistance than the normal. Of especial significance in this connection may be mentioned available carbohydrates and certain organic and amino acid radicles.

No correlation was apparent between the extent of growth or sporulation and the resistance of the spore produced. The initial reaction of the medium in which the spores were formed was found to be without influence. The temperature of cultivation, however, was found to be of considerable significance, the higher temperatures resulting in spores of an enhanced resistance.

Cultivation in a medium with the surface tension reduced by the addition of bile resulted in spores of normal resistance.

It was found that the time necessary to sterilize a suspension at a given temperature increased as the concentration increased. With uni-

form concentrations the time necessary to sterilize decreased as the temperature increased.

No effect was apparent as a result of heating in a solution of increased density, or in tubes of different lengths. Exposure of the cultures to X-rays before incubation had no effect on the resistance of the spore produced.

Evidence has been acquired which emphasizes the necessity of using strained suspensions in heat resistance tests. Irregular and erroneous results will be obtained unless this precaution is observed.

Confirmation of the results of previous workers on the disinfecting action of the hydrogen and hydroxyl ions has been obtained, and a possible explanation advanced.

Desiccated spores exhibited a resistance in excess of that exhibited by young, moist spores. Spores stored for an equal length of time in a moist condition were not, however, appreciably changed in resistance.

The course of mortality, as determined by quantitative plating at various time intervals, was not of such a nature that it could be described by the equation for a first order chemical reaction.

Dormancy, either of heated or unheated spores, was not exhibited by the culture used in this study.

The resistance of the spores was increased by a process of selection of resistant cells. Efforts to increase the resistance by cultivation in mediums which regularly yielded spores of an enhanced resistance were not successful.

Attempts to produce spores in any appreciable quantity in synthetic mediums prepared from highly purified chemicals met with failure.

Evidence gleaned from the literature and accumulated during the progress of this work supports the idea that the cause of death in cells exposed to a high temperature is the coagulation of bacterial protein. Conditions which render protein more difficult to coagulate consequently result in an increased resistance to heat. The water and the ash content of the cell appear to be especially important in this connection. However, cultivation under certain nutritive conditions which do not appear to be intimately related to either the water or ash of the cell has invariably resulted in the production of resistant spores.

#### ACKNOWLEDGMENT

The work embodied in this report was carried out under the direction of Dr. Karl F. Meyer. It is a pleasure to acknowledge indebtedness to him for his stimulating interest in the problem and for his helpful advice on numerous occasions.



## BIBLIOGRAPHY

1. Am. Pub. Health Assoc., standard methods for the examination of water and sewage, 1923.
2. Moyen de conférer artificiellement l'immunité contre la charbon symptomatique ou bactérien avec du virus atténué, *Compt. rend. Acad. de Sc.*, 1882, 95, p. 189.
3. Ueber die Darstellung salzfreier Albuminlösungen vermittelst der Diffusion, *Pfäuger's Archiv*, 1874, 8, p. 75.
4. Use of the single cell method in obtaining pure cultures of anaerobes, *J. Exper. Med.*, 1920, 32, p. 295.
5. Resistance of microorganisms suspended in glycerin or oil to the sterilizing action of heat, *Centralbl. f. Bakteriologie*, 1 ref., 1914, 59, p. 358.
6. The thermal death point in relation to time of typical thermophilic organisms, *J. Infect. Dis.* 1920, 27, p. 602.
7. Ueber die Temperaturmaxima der Sporenkeimung und der Sporenbildung, sowie die supramaximalen Tötungszeiten der Sporen der Bakterien, auch derjenigen mit hohen Temperaturminima, *Centralbl. f. Bakteriologie*, 2, 1905, 15, p. 97.
8. Einige Ergebnisse des Studiums des Verwendungsstoffwechsels der Bakterien. *Krankheitsforsch.*, 1925, 1, Hft. 3.
9. Botanische Untersuchungen ueber Schimmelpilze, Hft. 4, 1881.
10. Hydrogen ions, titration and the buffer index of bacteriological media, *J. Bact.*, 1921, 6, p. 555.
11. *Arch. f. Exper. Path. u. Pharmacol.*, 1875, 4, p. 1 (cited by Dozier, *J. Infect. Dis.*, 1924, 35, p. 156).
12. Resistance of spores to heating in anhydrous fluids such as glycerol and similar substances, *J. Hyg.*, 1913, 13, p. 168.
13. (a) The effect of heat on the spores of *Bacillus botulinus*: its bearing on home canning methods. Part 1. *J. Am. M. A.*, 1919, 72, p. 88; (b) Studies on the thermal death time of spores of *Clostridium botulinum*. 3. Dormancy or slow germination of spores under optimum growth conditions, *J. Infect. Dis.* 1923, 33, p. 274.
14. Studies on the thermal death time of spores of *Clostridium botulinum*. 2. The differential staining of living and dead spores, *J. Infect. Dis.*, 1923, 32, p. 433.
15. Dormancy in bacteria. *J. Infect. Dis.*, 1925, 36, p. 555.
16. Studies on the nature of the combination between certain acid dyes and proteins. *J. Biol. Chem.*, 1927, 72, p. 707.
17. On the heat coagulation of proteins. *J. Physiol.*, 1911, 43, p. 1.
18. An investigation of the laws of disinfection. *J. Hyg.*, 1908, 8, p. 92.
19. Die Ursache der Resistenz der Sporen gegen trockne Hitze. *Archiv. f. Hyg.*, 1891, 13, p. 71.
20. Die Desinfektionswirkung von Sagrotan bei Verwendung optimaler Nährboden zur Nachkultur. *Hyg. Rundschau*, 1918, 28, p. 1.
21. Studies on the Thermal Death Time of Spores of *Clostridium botulinum*. *J. Am. M. A.*, 1922, 79, p. 1239.
22. Studies on the thermal death time of spores of *Clostridium botulinum*. IV. The resistance of spores to heat and the dormancy or delayed germination of spores which have been subjected to heat, *J. Infect. Dis.*, 1925, 36, p. 472.
23. Report of five cases of infection by the *Bacillus aerogenes capsulatus* (Welch). *Bull. Johns Hopkins Hosp.*, 1897, 8, p. 68.
24. Über Bakterien, welche die fraktionierte sterilisation lebend überdauern. *Centralbl. f. Bakteriologie*, II, 1918, 48, p. 140.
25. Ueber die thermoresistenz der vegetativen Formen der aeroben Sporenbilder. *Centralbl. f. Bakteriologie*, 1. O., 1908, 48, p. 187.
26. Ueber einen neuer Anaeroben *Bacillus* und seine Beziehungen zum Botulismus. *Ztschr. f. Hyg.*, 1897, 26, p. 1.
27. Das Schicksal der pathogener Mikroorganismen im toten Körper. *Ztschr. f. Hyg.*, 1889, 7, p. 1.
28. Determination of thermal death time, chapt. 21 in *The Newer Knowledge of Bacteriology and Immunology*, edited by E. O. Jordan and I. S. Falk, 1928.
29. The change in the hydrogen-ion concentration of various mediums during heating in soft and pyrex glass tubes. *J. Infect. Dis.*, 1921, 29, p. 29.
30. The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes. *J. Infect. Dis.*, 1922, 31, p. 650.
31. Heat resistance studies—I. A new method for the determination of heat resistance of bacterial spores, *J. Infect. Dis.*, 1924, 34, p. 516.
32. The rôle of certain ions in bacterial physiology: a review. (Studies on salt action. VII.) *Abstr. Bact.*, 1923, 7, pp. 33, 133.
33. A contribution to the dynamics of toxicity and the theory of disinfection, *J. Bact.*, 1926, 11, p. 1.
34. Studies on some obligate thermophilic bacteria from soil, *Soil Sci.*, 1927, 23, p. 47.
35. The structure and functions of bacteria (translation by A. Coppen Jones), 1900.
36. Studies on aerobic spore-bearing non-pathogenic bacteria, *J. Bact.*, 1916, 1, pp. 273, 493.
37. Beiträge zur Kenntniss des Bakterienwachstums auf eiweissfreien Nährlösungen. *Hyg. Rund.*, 1894, 4, p. 769.
38. Zur Lehre von den Antiseptics. *Berlin klin. Wchnschr.*, 1889, 26, p. 789.
39. Ueber einen Kartoffel-Bacillus mit ungewöhnlich widerstandsfähigen Sporen. *Ztschr. f. Hyg.*, 1888, 3, p. 322.

40. Notiz über die Widerstandsfähigkeit des Sporen von *Bacillus subtilis* gegen Wasserdampf von 100 C. Centralbl. f. Bakteriologie, 1888, 3, p. 576.
41. Ueber die Methoden der Prüfung von Desinfektionsmitteln. VII internationaler Kongress für Hygiene und Demographie zu London. Centralbl. f. Bakteriologie, 1891, 11, p. 115.
42. The discoloration, smut or blackening of canned lobster. Trans. Roy. Soc. Canada, sec. V, 1923, p. 145.
43. The measurement of the heat resistance of bacteria. Centralbl. f. Bakteriologie, II, 1926, 67, p. 162.
44. The relation of hydrogen-ion concentration of media to the proteolytic activity of *Bacillus subtilis*. Mass. Agric. Exper. Sta. Bull. 167, 1916.
45. Influence of temperature and hydrogen ion concentration upon the spore cycle of *Bacillus subtilis*. J. Gen. Physiol., 1918-19, 1, p. 421.
46. The potassium requirements of *Bacillus subtilis*. Abstr. Bact., 1918, 2, p. 2.
47. Studies on bacterial nutrition. The utilization of nitrogenous compounds of definite chemical composition. J. Infect. Dis., 1919, 24, p. 301.
48. Differential staining of living and dead bacterial spores. Jour. Bact., 1925, 10, p. 25.
49. On the use of trypticized casein, bromthymol-blue, brom-cresol-purple, phenol red and brilliant green for bacteriological nutrient media. Brit. J. Exper. Path., 1925, 6, p. 291.
50. Die chemischen Grundlagen der Lehre von der Giftwirkung und Desinfektion. Ztschr. f. Hyg., 1897, 25, p. 1.
51. Biochemical studies on the bacillus tuberculosis. J. M. Res., 1901, 6 (n. s. 1), p. 135.
52. Gelatine und Tetanus. Resistenzfähigkeit der Tetanussporen. Sterilisation der Gelatine. Mitt. a. d. Grenzgebieten der Med. u. Chir., 1902, 10, p. 235.
53. The precipitation of iron compounds from salts of organic acids by some species of Eubacteriales. Centralbl. f. Bakteriologie, II, 1928, 75, p. 45.
54. Bacterial antagonism with special reference to the effect of *Pseudomonas fluorescens* on spore forming bacteria of soils. J. Bact., 1929, 17, p. 89.
55. Ueber die Ursache der Widerstandsfähigkeit der Sporen gegen hohe Temperaturen. Archiv f. Exper. Path. u. Pharmakol., 1890, 26, p. 341.
56. Toxic and antagonistic effects of salts as related to ammonification by *Bacillus subtilis*. Bot. Gaz., 1909, 48, p. 105.
57. On physiologically balanced solutions for bacteria (*B. subtilis*). Bot. Gaz., 1910, 49, p. 207.
58. Dormancy of spores of *Cl. acetobutylicum* and *Cl. pasteurianum*. Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1928, 25, p. 753.
59. Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Spaltpilze. Die organische Säuren als Nährstoffe und ihre Zersetzbarkeit durch die Bakterien. Arb. a. d. Kais. Gesundheitsamte, 1895, 12, p. 340.
60. Studies upon bacterial spores I. Thermal resistance as affected by age and environment. J. Bact., 1926, p. 253.
61. Studies upon bacterial spores II. Increasing resistance to heat through selection. J. Infect. Dis., 1926, 38, p. 429.
62. On the coagulation of proteins by heating. Compt. rend. du Lab. Carlsberg, 1924, 15, p. 1.
63. Immunologic disparities of spore and vegetative stages of *B. subtilis*. J. Immunol., 1919, 4, p. 203.
64. Studies in microbic heredity X. The agglutinin absorption reaction as related to the newer biology of bacteria, with special reference to the nature of spore formation. J. Immunol., 1926, 12, p. 355.
65. Some conditions affecting the production of gelatinase by *Proteus* bacteria. J. Bact., 1928, 15, p. 267.
66. De la resistance des spores des bactéries aux températures humides égales et supérieures à 100°. Ann. Micr., 1895, 7, pp. 110, 158, 205.
67. Einige Beobachtungen über die Milzbrandbacillen. Arch. f. Exper. Path. u. Pharmakol., 1886, 21, p. 309.
68. Marine spore-forming bacteria. Contrib. to Canadian Biol., 1924, (n. s.), 1, p. 377.
69. The relation of *Bacillus botulinus* to certain phases of home economics and agriculture. 21st Mich. Acad. Sci. Rept. 127, 1919.
70. (a) Thermophilic and thermoduric microorganisms with special reference to species isolated from milk. I. Review of literature. New York Agric. Exper. Sta. Tech. Bull. 130, 1927; (b) II. The thermal resistance of microorganisms. Vermont Agric. Exper. Sta. Bull. 274, 1927; (c) III. Description of the nonspore-forming thermoduric organisms isolated. N. Y. Agric. Exper. Sta. Tech. Bull. 131, 1927; (d) IV. Effect of age of culture on the heat resistance of nonspore-forming bacteria. Vermont Agric. Exper. Sta. Bull. 275, 1927.
71. Depressionszustände und Regulationsvorgänge bei dem Bact. anthracis. Archiv. f. Protistenkunde, 1907, 10, p. 247.
72. Zur Kenntniss der bei höherer Temperatur wachsenden Bakterien- und Streptothrix arten. Ztschr. f. Hyg., 1900, 33, p. 313.
73. Soc. Am. Bact. Manual of methods for pure culture study of bacteria, 1923.
74. Evidence on the indispensable nature of zinc and boron for higher green plants. Plant Physiol., 1926, 1, p. 231.
75. Ueber den Einfluss des Nährstoffgehaltes von Nährboden auf die Raschheit der Sporenbildung und die Zahl und Resistenz der gebildeten Sporen. Arch. Hyg., 1899, 35, p. 1.
76. Peptic and tryptic digestion products as inexpensive culture mediums for routine bacteriologic work. J. Infect. Dis., 1918, 23, p. 68.
77. Synthetic culture media and the biochemistry of bacterial pigments. J. M. Res., 1905, 14, p. 109.

78. Ueber die Resistenz der Bakterien und ihre experimentelle Prüfung. Sitzungsber. d. Gesellsch. f. Morphol. u. Physiol. in München., 1916, 30, p. 42.
79. *Clostridium botulinum*. IV. Resistance of spores to moist heat. J. Bact., 1923, 8, p. 269.
80. Ueber eine eiweissfreie Nährlösung für pathogene bakterien nebst einigen Bemerkungen über Tetanustgift. Centralbl. f. Bakteriologie, 1893, 14, p. 316.
81. Studies on the metabolism of *B. botulinus* in various media. J. Bact., 1925, 10, p. 321.
82. Ueber Verderber von Gemüsekonserven. Centralbl. f. Bakteriologie, II, 1906, 16, p. 489.
83. Das kolloidale Verhalten der Muskeleiweisskörper. Biochem. Ztschr., 1925, 158, p. 443.
84. Zur Biologie der Milzbrandbacillen. Arch. Hyg., 1899, 35, p. 355.
85. Die Sporenbildung des Milzbrandes bei Anaerobiose. Ztschr. Hyg., 1901, 36, p. 451.
86. The heat resistance of spores with special reference to the spores of *B. botulinus*. J. Infect. Dis., 1921, 28, p. 70.
87. Die Spaltpilze, 1885 (cited by Robertson 70b).







AN EXPLOITATION ELECTRODE  
TO DETERMINE THE HYDROGEN-  
ION CONCENTRATION OF FLUIDS  
IN LIVING TISSUE

By

HENRY EHRENBERG, D.Sc.  
San Francisco, Calif.

---

Reprinted from

THE JOURNAL OF LABORATORY  
AND CLINICAL MEDICINE  
St. Louis

---

Vol. XV, No. 2, P. 181, November, 1929



# AN EXPLORATION ELECTRODE TO DETERMINE THE HYDROGEN-ION CONCENTRATION OF FLUIDS IN LIVING TISSUE\*

BY HENRY EHRENBERG, D.Sc., SAN FRANCISCO, CALIF.

WHILE determining the hydrogen-ion concentration of plant fluids, an electrode has been developed which makes possible these determinations directly on the plant. The instrument works equally well for the determination of the  $P_H$  of healthy and diseased tissue in man and animal. It can be brought directly in contact with a focus of infection or with the secretion of a gland.

The instrument to be described can readily be made in the laboratory. Figs. 1 and 2 show the simplicity of the parts and are to a great extent self-explanatory. The letter *A*, Fig. 1 ( $\frac{2}{3}$  actual size), designates the electrode point and *B* the electrode holder which has a hydrogen inlet and a rubber connection *E*. The latter keeps the electrode *C* in place and prevents the escape of hydrogen. *D*, Fig. 2 ( $1\frac{1}{2}$  actual size) shows the lower half of the electrode assembly connected with an agar-agar KCl bridge. It is in position and in contact with the fluid to be measured. The contact is made possible by the glass tube *C* being of larger diameter than the inside diameter of the capillary end of *B*. On stopping the flow of hydrogen and raising *C* in *B*, liquid is pulled up in the capillary through a greater height than the electrode moves. Raising the electrode thus until contact with the liquid is established the correct E.M.F. can at once be measured.

It is needless to emphasize that the usual precautions, temperature, pure hydrogen, correct set-up, and functioning of the remainder of the apparatus, must be observed. Tight rubber connections are essential. A pointer galvanometer (Nó. 2320 Leeds & Northrup), in connection with a saturated KCl calomel electrode, is sufficiently sensitive to produce an easily noticeable deflection for a 0.01  $P_H$ , and with a magnifying glass for a 0.005  $P_H$ . Considering the influence of temperature variations alone, the accuracy gained by closer reading is illusory.

For explorations a  $\frac{1}{8}$  inch rubber tube of suitable length with a glass capillary (Fig. 2) filled with saturated KCl agar-agar serves as a flexible bridge connecting the calomel electrode. A thin copper wire connects the hydrogen electrode with the potentiometer. The electrode is held by a long movable clamp attached to a support and can thus be moved from place to place.

## ELECTRODES

To work well and to get good results the electrode points must be one millimeter thick, not less, and not much thicker. They are made of platinum or pure gold, or, better still, of platinum alloy rich in iridium. The latter is especially useful and reliable under trying conditions, some of which are

\*From the University of California Laboratory for Research in the Canning Industries, San Francisco, Calif.

Received for publication, February 12, 1929.



stated below, and under which platinum and gold electrodes have been found unsatisfactory. Thinner wires give a variable and sinking E.M.F. A 10 to 11 mm. length of the wire is welded to a  $\frac{1}{4}$  mm. thick platinum wire, a simple operation with a pair of smooth, flat pliers. A tiny piece of gold foil is a good solder for platinum. The wire is then polished until it is smooth. The unplatinized part of the wire in the glass tube should be as thin as specified, and be short, in order not to abstract much hydrogen from the platinized part which would also result in a low E.M.F. An electrode thus made will keep a constant E.M.F. for hours in a strong pure buffer solution. The thick end is cut off smooth and square. If the thin end is fused into the glass tube *C* of the size illustrated, then the mercury will not run out when the tube is inverted. A coat (thin) of palladium is preferable to platinum because it is more easily removed. This is important for gold or gold-soldered electrodes, since the chlorine liberated by electrolysis dissolves gold readily.

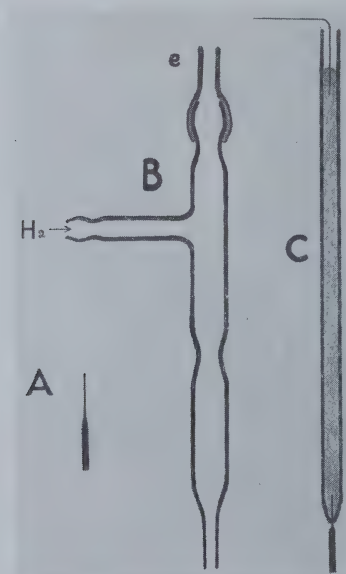


Fig. 1.

The contractions of the electrode holder must be well centered and must fit the electrode snugly so that its point cannot chafe against the glass wall of the capillary and rub off the black deposit. With proper care a great number of determinations can be made before repalladinizing, itself a very simple and short operation.

#### OPERATION

A gentle stream of moist hydrogen is passed through the electrode holder immersed in a check buffer of known  $P_{H_2}$ . After all air has been washed out the hydrogen is cut off and the electrode raised until the entering buffer touches the point. The correct E.M.F. signifies that it functions properly. The capillary with agar agar bridge and electrode point is now flushed in distilled water by pinching the hydrogen rubber connection. The electrode is then moved to the

tissue surface. By depressing the tissue slightly, as is shown in Fig. 2, fluid gathers there. This is drawn into the capillary and its E.M.F. measured. Repeated contacts should be made to be sure that it is constant. If the moisture is insufficient a drop of distilled  $\text{CO}_2$ -free  $\text{H}_2\text{O}$  is added. A better way still is to immerse the tip of the electrode capillary into conductivity water, bubble a little hydrogen through it, seal the capillary with a drop of water and then put it in position. The electrode is manipulated, or the rubber connection pinched so that the drop works in and out, care being taken to exclude bubbles of air. The drop will mix with the sap and its  $P_H$  can be determined. Where the available moisture is minute, as on a ligament or the surface of an organ, the dilution with even one drop of water is enormous. If this drop contains impurities, inaccurate E.M.F.'s will result. A low  $P_H$  is caused by  $\text{CO}_2$ . The correct value may be attained if the  $\text{CO}_2$  is blown out by a gentle

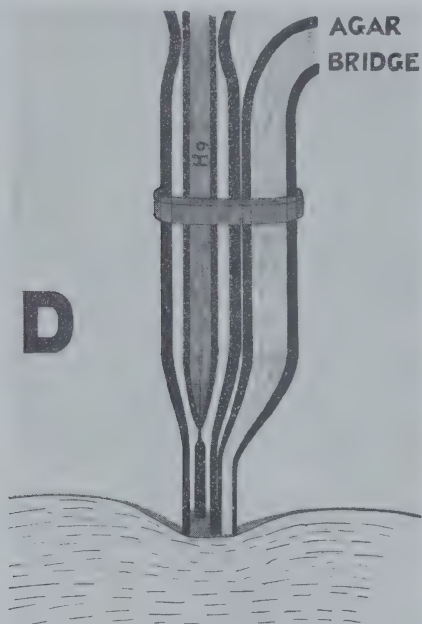


Fig. 2.

stream of hydrogen. This is possible in many instances. With pure water no difficulties will be encountered and the correct E.M.F. is easily obtained. With some solutions, especially those low in buffer, the E.M.F. has a tendency to drop and is highest only at the first moment of contact. On the other hand, with strongly buffered physiological solutions, the  $P_H$  usually remains constant. At the first trial with the electrode, on the peritoneum of a mouse, the  $P_H$  remained for over an hour at 7.46. For the whole  $P_H$  range the values obtained with this electrode agree with the values obtained with the foil electrode.

The fluids of living animal tissue are very rich in buffers and also are highly ionized. Both these properties are of great advantage. The richness in buffers allows considerable dilution; it enables the attainment of an immediate, constant E.M.F., usually at the first contact; the high ionization

makes possible a large current and a correspondingly big deflection of the galvanometer for a minute difference in E.M.F.

With a properly functioning electrode, the correct E.M.F. is established immediately on contact, hence the  $\text{NaHCO}_3$ ,  $\text{CO}_2$  equilibrium in blood is not likely to be disturbed. Thus its  $P_H$  can possibly be determined directly at the point of incision. Since the  $\text{CO}_2$  escapes into the atmosphere, however, no equilibrium of the E.M.F. is attainable and one may be doubtful which value is correct. The trials made as yet are too few to warrant the formation of any opinion.

#### CALCULATION

The E.M.F. of the hydrogen electrode is determined by the concentration and temperature of the hydrogen and the concentration of the hydrogen ions. In the point electrode the temperature is that of contact with the fluid measured. The  $P_H$  is calculated from the well-known formula:

$$\text{E.M.F.} = E - \frac{RT}{nF} \log \frac{C_1}{C_2}$$

where E.M.F. is the electromotive force indicated by the potentiometer,

E the potential of the calomel electrode

and

$$\frac{RT}{nF} \log \frac{C_1}{C_2} \text{ the expression for the hydrogen potential.}$$

Disregarding the + or - signs, nonessential in this problem, we get:

$$\text{E.M.F.} = E + 0.0591 \log C_2 \text{ (H}_2^{25^\circ}\text{)}$$

$\log C_2$  is the  $P_H$ .

As examples for different temperatures for the hydrogen electrode and saturated KCl calomel electrode let

$$\text{E.M.F.} = 0.683v$$

Then with the calomel and hydrogen electrodes at the temperatures indicated:

$$\begin{array}{rcl} \text{E.M.F.} & = & E^{25^\circ} + 0.0591 \log C_2 \text{ (H}_2^{25^\circ}\text{)} \\ (1) \quad 0.683 & = & 0.246 + 0.0591 (x) \\ 0.437 & = & x = 7.4 = P_H \\ \hline & & 0.0591 \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} \text{E.M.F.} & = & E^{25^\circ} + 0.0616 \log C_2 \text{ (H}_2^{37.5^\circ}\text{)}^* \\ (2) \quad 0.683 & = & 0.246 + 0.0616 (x) \\ 0.437 & = & x = 7.1 = P_H \\ \hline & & 0.0616 \end{array}$$

$$\begin{array}{rcl} \text{E.M.F.} & = & E^{37^\circ} + 0.0616 \log C_2 \text{ (H}_2^{37.5^\circ}\text{)} \\ (3) \quad 0.683 & = & 0.235 + 0.0616 (x) \\ 0.448 & = & x = 7.3 = P_H \\ \hline & & 0.0616 \end{array}$$

Working at such a high temperature as  $37^\circ$  the temperature coefficient of the standard cell, Weston or Clark, and the increased resistance of the potentiometer, calibrated for  $25^\circ$ , must not be neglected. Considering the

\*Mislowitz: Die Bestimmung der Wasserstoffionenkonzentration, J. Springer, Berlin, Germany, p. 167-170, 1928. Clark: The Determination of Hydrogen Ions, Williams & Wilkins, Baltimore, p. 314, 1928.

errors all these corrections imply, it is far better to work in a room at 25°, get the temperature factor for the hydrogen electrode by measuring the E.M.F. of a strong buffer of the  $P_H$  range involved at 25° and at 37.5° and apply the difference.

#### APPLICATION

This electrode is giving satisfactory results in our laboratory. It allows the determination of hydrogen-ion concentrations of viscous fluids, of solutions containing sediments and coarse suspended matter which would clog a foil electrode. Often even the  $P_H$  of a fluid which would poison a foil electrode can be obtained. The arrangement in Fig. 2 gives good results with thick, almost solid gels, by merely placing a drop of freshly boiled pure water at the point of contact. With the foil electrode the solution has to be saturated with hydrogen before equilibrium is reached and with increase in volume the time is proportionately longer. The correct E.M.F. with the point electrode is almost always obtained instantaneously, regardless of the amount of fluid used.

The electrode and method are well adapted for  $P_H$  determinations on a large scale. Sixty tests an hour can readily be made with pure buffer solutions. Over five thousand E.M.F. determinations have been made during the past year in this laboratory, where it has supplanted the foil electrode for almost all except electrometric titrations.





THE COMMERCIAL PACKING OF CALIFORNIA  
MACKEREL

PRELIMINARY REPORT

BY

O. W. LANG AND R. S. FELLERS

UNIVERSITY OF CALIFORNIA PUBLICATIONS IN PUBLIC HEALTH

Volume 1, No. 5, pp. 295-305

Issued September 17, 1929

UNIVERSITY OF CALIFORNIA PRESS

BERKELEY, CALIFORNIA

---

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

LONDON, ENGLAND

# THE COMMERCIAL PACKING OF CALIFORNIA MACKEREL

## PRELIMINARY REPORT\*

BY

O. W. LANG AND R. S. FELLERS

(From the George Williams Hooper Foundation for Medical Research, Laboratory for Research  
in the Fish Canning Industries)

## CONTENTS

	PAGE
INTRODUCTORY.....	295
MODES OF FISHING.....	296
THE CANNING PROCEDURES.....	297
Size of Fish.....	297
Receipt and Treatment of Hold-over Fish.....	297
Maximum Length of Time of Holding Mackerel.....	298
Butchering, Cleaning, and Brining.....	298
Present Practice.....	298
Recommendations. Butchering and Cleaning.....	299
Recommendations. Brining.....	299
Canning and Packing.....	300
The influence of exhaust or precook on canning weights and shrinkage.....	300
Exhaust or precook: Conclusions.....	301
Canning weights for number 1 tall cans.....	302
Sterilization or processing.....	304
SUMMARY.....	304
BIBLIOGRAPHY.....	305

## INTRODUCTORY

\* The canning of California Mackerel (*Scomper japonicus*) in considerable amounts had its inception in 1916. Since then small quantities have been prepared according to a process similar to that which is used for tuna. A spiced fileted pack has been canned in one-pound ovals as well as the salmon-style pack in various-sized containers. This activity was not very extensive, however, until the 1927 season, when 10,725 cases of number 1 tall and 236 cases of 1/2-pound cans were marketed.

Following the 1927 season, production has been on a steady increase, and where formerly only two plants were engaged, there are now sixteen, of which four are located in Monterey, eight in the San Pedro and Long Beach area, and four in San Diego. An idea of the production in 1928 may be gained from the data presented in table 1.

\* Aided by grants from the California State Fish and Game Commission.



TABLE 1  
1928 MACKEREL CASE PACK\*

District	Can sizes		
	No. 1 talls	$\frac{1}{2}$ pound Tuna	$\frac{1}{4}$ pound Tuna
Monterey.....	1,030		
San Pedro area.....	357,136	4,717	
San Diego.....	25,110	208	270
Total pack to October, 1928.....	383,276	4,925	270

\* The data have been secured through the courtesy of the California State Fish and Game Commission.

The reason for this outstanding increase may be attributed to shortages as well as to the competitive favor shown toward certain grades of salmon. Other factors which may have instigated, or may have played an important rôle in, the increase of mackerel-canning are the recent and easy accessibility to fishing areas which at present are close to the cannery docks, and the abundance of fish throughout the year. It is generally believed that the mackerel is migratory; but in recent years a number have been encountered in catches of sardines from certain regions.

Since the canning procedures in the past have been comparatively simple, the equipment employed in packing tuna and sardines has been used. The mackerel-canning season bridges the tuna and the sardine seasons, consequently an experienced cannery personnel, which has heretofore been idle during the slack periods, may now be steadily employed.

### MODES OF FISHING

Two modes of fishing, namely, the Lampara (round haul net) and hook and line are employed. In the use of the seine, the fish are attracted into schools by "chumming," which consists of tossing overboard finely divided particles of ground bait. After a school of sufficient size has gathered the fish are surrounded by the net and the haul is made. Hook-and-line fishing for mackerel just as the name implies, needs no further description.

Thus far, all fishing is done during the day. The boats usually return to the cannery dock during the late afternoon. The time of hauls is seldom longer than four to five hours, and, with few exceptions, the fish arrive at the cannery in excellent condition. There they are received in tuna carts, are weighed, and then dumped on the floor. If the fish are received late in the day and too late for canning, the catch is covered with crushed ice and canned on the following morning. In some plants, refrigerating methods are used, the fish being held either in sharp rooms or in a cooled brine. The fish next pass through the processes of butchering, cleaning, brining, and canning. All these processes are described in detail later on.

Certain difficulties have been encountered in canning mackerel and these have increased proportionately with the rise of the industry. Since some of them have proved rather serious, the Laboratory for Research in the Fish Canning Industries undertook a series of studies which covered the following operations: adequate process times and temperatures to insure a sterile and merchantable product, standardization of the pack with respect to canning weights and canning procedures, and means of enhancing the quality. Studies have also been made on the size of the fish in relation to canning, handling of the catch, the treatment of "hold-over" fish, the maximum length of time that mackerel can safely be held prior to canning, butchering, cleaning, brining, fill weights, precook or exhaust, and sterilization. The most important results of these investigations are briefly detailed below. Additional data will be published as soon as further information has been collected.

## THE CANNING PROCEDURES

### SIZE OF FISH

As previously mentioned, there are two methods employed in fishing for mackerel, namely, by seine, and hook and line. The catches resulting from the use of these two methods differ as greatly as do the methods.

The seined fish, as a rule, vary greatly with respect to size and weight, and a catch usually contains a greater number of small rather than large individuals. The average weight of the seined fish is approximately three-quarters to one pound.

The hook-and-line fish are not only more uniform with respect to size, but the individuals are often larger and heavier. A distinction may, therefore, be drawn between these two catches.

From a canning standpoint, it is more desirable to pack the larger individuals in one-pound tall cans, since they make a more attractive pack, and to reserve the smaller individuals for cans of a smaller diameter, such as the eight-ounce sauce can, or the number one eastern-oyster can.

### RECEIPT AND TREATMENT OF "HOLD-OVER" FISH

The mackerel, on being received at the cannery, should be placed in tanks. When received late in the day, and too late for canning, the fish should be held in a concentrated and iced brine solution or subjected to almost freezing temperatures, as in a sharp room. Since their skin and flesh bruise very easily, care must be exercised in handling them. When placed in a sharp room they should not be too heavily packed in the boxes. On the other hand, when the fish are placed in a cold brine solution, a sufficient allowance should be made for the content of an excess amount of brine to prevent their being crushed. Wherever fish are held on the floor, proper drainage should be provided and an adequate amount of crushed ice should be incorporated throughout the catch. This latter method, however, is not advocated. To allow the fish to lie on the floor over-night without adequate icing or proper drainage facilities is to be condemned.

## MAXIMUM LENGTH OF TIME OF HOLDING MACKEREL

The maximum length of time that mackerel out of the water can be held and still remain suitable for canning is a debatable question, and depends entirely upon the temperature and surrounding conditions.

Brown (1917) in his work on the decomposition of various fish during storage in ice concluded that autolysis rather than bacterial action seems to play the most important part in the initial stages of decomposition. Hunter (1919) in his study on the bacterial decomposition of salmon stated that salmon out of the water more than forty-eight hours, and held at a temperature range between 50° F and 70° F, are decomposed to such an extent that they are not desirable for food. In a later article Hunter (1922) concludes that during the first forty-eight hours out of the water, under ordinary conditions, immature, "feedy" salmon show but little physical evidence of decomposition. From that time on, decomposition is readily detectable by discolored and foul-smelling gills, dull and sunken eyes, dry and cracked skin, softened flesh, and an offensive odor from the whole fish.

His work was later corroborated by C. R. Fellers (1926) in his article on "Bacteriological Investigations on Raw Salmon Spoilage." Fellers held five different species of salmon at a temperature range of 51° F and 74° F. He noted that the smaller-sized fish decompose more rapidly than those larger in size.

Investigations with respect to the decomposition of mackerel were made by Clark and Lang (1929). The fish in this experiment were held at a temperature range of 47° F and 64° F. While the storage temperatures of these fish were much lower than those encountered by either Hunter or Fellers, the conclusions, in general, tend to confirm their observations; namely, that at temperatures of 48° F to 64° F the fish remain in suitable condition for forty-eight hours. After forty-eight hours, spoilage progresses rapidly, and the fish must not be used for canning.

The investigations indicate that the temperature influences the maximum length of time at which mackerel may be held without showing signs of decomposition.

If in any way practical, the fish should be packed within twenty-four hours after they are caught. In case a catch has to be held, proper icing or storage in brine should be provided. It is imperative that only fresh raw material be canned. Care should therefore be taken not to accept mackerel in quantities exceeding the cannery capacity.

## BUTCHERING, CLEANING, AND BRINING

## PRESENT PRACTICE

Butchering is usually performed at a series of small wooden tables. The head, tail, and viscera are removed first. The butchers then toss the cleaned fish into a bath of running water in the center of the table. On the opposite side of the table the cleaners remove the blood and membrane from the body cavity with either small spoons or brushes. As a rule, fresh water is used for



the cleaning operations; however, in some instances harbor water has also been employed. The next operation consists of cutting the fish into proper lengths for canning.

After cleaning, the fish are either canned or immersed in a brine solution. Brining varies from merely adding the cut fish to the brining vat until it is filled, then removing them to the packers, resulting in an irregular and indefinite brining time, to a definite period with a known concentration of salt. In certain plants, the same brine is used throughout the packing day with only the addition of more salt, while in others the brine is completely changed after each batch of cut fish has been removed.

#### RECOMMENDATIONS. BUTCHERING AND CLEANING

Mackerel readily decomposes when bruised. Furthermore, the adherent slime serves as an excellent means of bacterial contamination; care must therefore be exercised in the course of the butchering and cleaning operations. After removing the head, viscera, and tail, the body cavity should be well cleaned, then scraped free of blood, slime, and adhering membrane. The surface of the fish should be treated in a similar manner, then thoroughly washed in a stream of fresh running water.

Provision should be made for cleaning tables similar to those used in the sardine industry. Such a table has been installed in one cannery to great advantage. On one side of the table the butchering is done while on the other the cleaning operations are carried out. In the center of the table are a series of small sinks, one for each cutter and cleaner. After removing the head, tail, and viscera, the fish is placed in a sink of fresh, running water. The cleaner removes the slime and membrane by holding the fish against a circular brush which is revolving at high speed. A small segment of the brush is submerged in the water, while a metal guard placed over the upper portion prevents splashing. Thus, the fish receive a rinse as well as a thorough cleaning. The operation is very effective and rapidly performed. The cleaned fish is then transported to the cutting machine by a belt conveyor installed in the center of and over the cutting table.

#### RECOMMENDATIONS. BRINING

After cutting into required lengths the fish should be brined in a saturated salt solution. Such a treatment removes residual slime, imparts a firmer texture to the flesh and skin, and frees the fish of certain objectionable odors and flavors characteristic of the mackerel. A brining time of two hours in a saturated salt solution has given very satisfactory results. A new batch of brine should be prepared for each successive tank-load of cut fish.

The practice of holding cut fish over-night in brine is not advocated since it renders the product too salty, and gives a rather flinty cast to the flesh.

Fresh water should be used in all the above canning operations since repeated examinations of the harbor waters have proved that the present sources of supply are polluted by raw sewage and cannery waste.



Since the brining tanks are subject to the same contaminations as in the canning of sardines, they should be coated with the paint previously recommended for this purpose.

#### CANNING AND PACKING

Canning is usually performed at the extreme end of the cleaning tables where the cut fish are packed by hand into the cans. Another custom is to transport the fish in wire baskets to the packers at canning tables removed from the butchering and cleaning room. Packing consists of placing a sufficient amount of fish in each can until it is visibly full. The cans are then racked in retort baskets or in tuna trucks, and subjected to a precook of varying times and temperatures. The use of a continuous exhaust box has also been employed for this purpose. As a rule the cans after being precooked, receive a small charge of brine, after which they are sealed, washed, and retorted.

#### THE INFLUENCE OF EXHAUST OR PRECOOK ON CANNING WEIGHTS AND SHRINKAGE

The canning weights obviously control the amount of head space, while the exhaust or precook, in connection with retorting, largely controls the shrinkage. In order to determine an adequate fill weight, it is necessary to determine the amount of shrinkage in connection with retorting and in connection with exhausting and retorting. A fill weight must necessarily be chosen which will compensate for the shrinkage.

Since nothing definite was known, experiments with respect to shrinkage of raw fish in connection with retorting alone, shrinkage encountered in exhausting and retorting, and shrinkage in the commonly used precooks and exhausts have been carried out. In each experiment carefully controlled fill weights of raw fish were packed. The essential data are shown in tables 2, 3, and 4. For the sake of brevity, only averages of each fill weight have been recorded. The drained weight (e.g., weight of fish remaining after draining two minutes on an one-eighth inch mesh screen) of each can has been determined.

TABLE 2  
SHRINKAGE OF RAW FISH IN CONNECTION WITH RETORTING

Net fill weight of raw fish in ounces*	Drain weight in ounces	Shrinkage in ounces
13 $\frac{1}{4}$	10 $\frac{3}{4}$	2 $\frac{1}{2}$
14	12 $\frac{1}{4}$	1 $\frac{3}{4}$
15	12 $\frac{3}{4}$	2 $\frac{1}{4}$
16	13 $\frac{3}{4}$	2 $\frac{1}{4}$
17	15 $\frac{1}{2}$	1 $\frac{1}{2}$
18	15 $\frac{3}{4}$	2 $\frac{1}{4}$

\* The cans were packed with the weights given of raw, cleaned, unbrined fish. Dry salt was added to each can, after which the can was sealed omitting the exhausting, then retorted. For the sake of uniformity, the cans were allowed to stand at room temperature for three days prior to examination.

TABLE 3

SHRINKAGE OF RAW FISH IN CONNECTION WITH PRECOOKING AND RETORTING

Net fill weight of raw fish in ounces*	Drain weight in ounces	Shrinkage in ounces
15¼	11¾	3½
16	12½	3½
17	13½	3½
18	14¾	3¼

\*These cans were packed with a definite fill weight of raw fish and precooked for 23 minutes at 214°F. Dry salt and hot water were added, after which the cans were sealed and retorted at 240°F for 95 minutes. The cans were allowed to stand for three days at room temperature before examining.

TABLE 4

SUMMARY OF GENERAL LOSSES IN WEIGHT

Treatment of raw fish	Average loss in weight in ounces
Retorted only.....	2
Cannery A—Exhausted 20 minutes—210°F.....	3
Cannery B—Precooked 23 minutes—214°F.....	3½
Cannery C—Precooked 36 minutes—220°F.....	3½
Cannery D—Precooked 40 minutes—215°F.....	3⅞

EXHAUST OR PRECOOK. CONCLUSIONS

The experiments tabulated above demonstrate that shrinkage or loss in weight in the cans which were retorted only is constant for practically any given weight of fish, while the exhaust and precook, in connection with retorting, entails an additional loss. It is essential, therefore, prior to retorting, to precook or exhaust the cans sufficiently to shrink the contents as much as is possible without injury to the quality of the pack.

As can be observed from table 3, exhaust and precook times of a wide variation are employed throughout the industry, all of which apparently accomplish the desired result with respect to vacuum. Unquestionably an adequate vacuum may be obtained with much shorter precook times and lower temperatures than those practiced at present. Nevertheless, since it is often customary to hold the precooked fish for one to three hours prior to processing, too much importance cannot be stressed upon an adequate exhaust or precook. Since it is in order, a minimum exhaust time of twenty-five minutes at 210° F is recommended for one-pound, tall cans of mackerel. An adequate exhaust is to be favored over the precook method, since the former is a continuous process and a very reasonable assurance may be had that each can on being discharged from the exhaust box is sealed under the same conditions.

The precook method has the disadvantage of being a broken process, consequently it is doubtful if as equally uniform results can be obtained as in the

continuous exhaust. For this method unsealed cans filled with raw fish are stacked vertically in retort baskets, and each layer of open cans is covered with a thin sackcloth. Another common practice is the use of tuna cookers in which the cans are racked in baskets.

The retort method of precooking should be discontinued in favor of the procedure which employs the tuna cooker, since the length of time required to fill a retort is too long to be practical. The open, packed cans are often allowed to stand for three to five hours in order to get a sufficient load for precooking. During this time bacterial contamination increases rapidly. Moreover, the cloths used to separate the different layers of cans soon become fouled with pieces of cooked fish and débris thus creating conditions highly favorable for contamination. It is earnestly hoped that this practice be discontinued.

The use of tuna cookers for exhausting is preferred to the retort method, since a full load may be attained in a much shorter time; furthermore, the cans are not packed so tightly as in the retort baskets; nor is it necessary to use a cloth to separate the layers of cans.

A practice has been in force in which the cans are precooked while open and in an inverted position. Such a procedure will obviate the adherence of particles of flesh to the bottom of the can. It is necessary, however, to add salt to supplant the amount which is lost in drainage. It is also desirable to divert the drippings from the top layer of the cans from the succeeding lower layers by a sheet metal covering, as difficulty has been experienced in washing the exudate free from the tin plate.

In the experience of the writers, no two precook periods in a given plant are identical with respect to time or temperature, although the cook-room operator endeavors to maintain conditions as closely as possible to those of former batches. In this respect, the lag period is often taken as part of the "cook." Since no two lag periods can be considered identical, it is advisable to control the handling of the cookers by the installation of suitable recording and mercury thermometers, as well as pressure gauges.

Until further studies have been completed, the laboratory recommends a precook of twenty minutes at 214° F to 216° F. On completion of the precook, it is important that only one rack at a time be removed from the cookers in order to obviate rapid cooling of the cans.

#### CANNING WEIGHTS FOR NUMBER 1 TALL CANS

In the matter of standardizing the weight of raw fish, it is essential to bear in mind the general appearance of the can when it is first opened, and the ability of the final product to withstand rough handling in transit.

Cans of a definite fill weight were packed, precooked for twenty-three minutes at 214° F, brined, sealed, and retorted. They were then allowed to stand for three days after which they were examined for vacuum, net content, drain weight, and head space. As in the preceding experiments, only averages of a definite number of cans of the same fill weight are recorded.



TABLE 5

Net fill weight of raw fish	Net weight after precook	Net weight after brining and retorting	Vacuum in inches	Drained weight—ounces	Head space in inches	
					To liquid	To fish
15¼	15½	16½	10	11¾	¾	¾
15½	16	16½	8½	12¾	¾	⅝
16	16¼	16¾	10	13	¼	½
16¾	16¼	16¾	9	13¾	⅜	⅜
17	16¾	17¼	12	13½	⅜	⅝
17½	17¼	17¾	9½	14¼	⅜	⅜
18	17¼	17½	9½	14¾	⅜	⅜

In noting the column “net weight after precook” a gain in weight has taken place in cans with fill weights ranging from 15¼ to 16 ounces, which may be attributed to the ultimate shrinkage below the lip of the can and absorption of condensation water during the precook, as well as brine added at the closing machines. The net contents of cans ranging from 16¾ to 18 ounces showed only a shrinkage; no head space being available for either condensation or added brine.

It has been observed that cans representing fill weights from 15¼ to 16½ ounces contain an average head space of ¾ of an inch to the liquor and approximately ⅝ to ¾ of an inch to the fish. These cans on being shaken (not too vigorously), and then opened, revealed a disintegrated mass of cooked fish.

From the standpoint of appearance as well as head space, cans with fill weights ranging from 16¾ to 17½ ounces were the most desirable. Cans with fill weights of 18 ounces were considered overfilled. After examining a number of cans, it has been observed that a desirable fill contains a head space of approximately ⅜ of an inch to the liquid and ⅜ to ¼ inch to the fish. The drain weight of such a pack ranges from 13½ to 14 ounces and the total net content is approximately 17 to 17½ ounces. In order to secure such a content, a canning weight ranging from 17 to 17½ ounces is required. If such a fill weight is adhered to, there appears to be very little or no value in adding brine to the cans after they are exhausted or precooked. An exception to this rule must be made when the cans have been precooked in an inverted position. In this case it is essential to add either hot brine or salt and hot water prior to sealing.

Balance weights should be packed in order to insure not only uniformity in fill but to avoid underfilling as well as overfilling. Since mackerel is a pack of two or more pieces, a very desirable appearing product may be attained where the large cuts surround those smaller in size.

Adequate supervision at the canning tables is advisable, more especially with inexperienced packers. If a machine is used for cutting the fish to size, it is preferable to separate the butt pieces from the center cuts since packing operations may be facilitated.



## STERILIZATION OR PROCESSING

Based on heat penetration studies or the length of time required for the can center to arrive at retort temperature, and on heat resistance experiments or the behavior of spoilage organisms toward mackerel, the following tentative processes have been adopted by the California State Department of Public Health.

MINIMUM INITIAL TEMPERATURE: 130° F

Can size	Can dimensions	Process	
		Time in minutes	Temperature
8-ounce Sauce.....	$2\frac{11}{16}" \times 3\frac{1}{4}"$	75	240°F
No. 1 E. O.....	$2\frac{11}{16}" \times 4"$	75	240°F
		120	230°F
No. 1 Tall.....	$3\frac{1}{16}" \times 4\frac{11}{16}"$	or 95	240°F
		or 75	250°F

## SUMMARY

1. The mackerel caught by the seine method vary greatly with respect to size and weight while the "hook-and-line" fish are, as a rule, larger and more uniform. The latter are more desirable for canning in number 1 tall cans. The suggestion is made with respect to the seined fish that the smaller individuals be packed in cans of a smaller diameter such as the eight-ounce "sauce" or No. 1 "eastern oyster" can.

2. On receipt at the cannery dock, mackerel should be placed in tanks. If held over-night, it is advisable to immerse the fish in an iced brine solution.

3. Mackerel may be held with safety for 48 hours out of the water at a temperature range of 48° F to 64° F, and still be desirable for canning. Thereafter spoilage takes place very rapidly, and the fish must be discarded.

4. The butchering operations should be effective to the extent that blood surrounding the backbone, the slime, and the adhering membrane are removed. Fresh water should be used in the butchering and cleaning operations. The utmost sanitary precautions should be practiced in the handling of the fish.

5. Brining the cut fish is a desirable practice since it has a tendency to remove certain objectionable flavors that are characteristic of the mackerel, as well as to impart a firmer texture to the flesh and skin. A brining time of two hours in a saturated salt solution has given very satisfactory results.

6. *The optimum fill weight of raw, cleaned fish packed in No. 1 tall cans is 17 ounces. The canner should adhere as closely as possible to this weight. He should not fill below  $16\frac{3}{4}$  ounces nor exceed  $17\frac{1}{2}$  ounces. Cans filled with less than  $16\frac{3}{4}$  ounces of raw fish are slack filled while those having a net fill greater than  $17\frac{1}{2}$  ounces are overfilled. It is advocated that balance weights be packed.*

7. An exhaust time of twenty-five minutes at 210° F or a precook of twenty-five minutes at 214° F to 216° F is advocated for mackerel. It should be understood that these times and temperatures are not so essential for attaining a vacuum when they are for shrinking the fish prior to sealing.

8. The processes enforced by the California State Department of Public Health for mackerel are as follows:

MINIMUM INITIAL TEMPERATURE: 130° F

Can size	Can dimensions	Process	
		Time in minutes	Temperature
8-ounce Sauce.....	2 <sup>11</sup> / <sub>16</sub> " x 3 <sup>1</sup> / <sub>4</sub> "	75	240°F
No. 1 E. O.....	2 <sup>11</sup> / <sub>16</sub> " x 4"	75	240°F
No. 1 Tall.....	3 <sup>1</sup> / <sub>16</sub> " x 4 <sup>11</sup> / <sub>16</sub> "	120	230°F
		or 95	240°F
		or 75	250°F

BIBLIOGRAPHY

BROWNE, W. W.  
1918. Do bacteria play an important part in the initial stages of decomposition of fish during storage in ice? *Abstr. Bact.*, 2:6.

CLOUGH, R. W., and CLARK, E. D.  
1926. Losses in salmon canning due to overfilling. *N. C. A. Bulletin*.

FELLERS, CARL R.  
1926. Bacteriological investigations on raw salmon spoilage. Univ. Washington Press.

HUNTER, A. C.  
1920. Bacterial decomposition of salmon. *Jour. Bact.*, 5:353-361.  
1922. Decomposition of feedy salmon. *Jour. Hygiene*, 2:368-378.

CLARK, P. B., and LANG, O. W.  
The decomposition of raw mackerel. (MS.)

LANG, O. W., and DEAN, S. J.  
1928. Waterproof coatings for sardine tanks. Hooper Foundation canning circular.









MATHEMATICAL SOLUTION OF PROBLEMS  
ON THERMAL PROCESSING OF  
CANNED FOOD

BY

CHARLES OLIN BALL

RESEARCH DIVISION, AMERICAN CAN COMPANY  
MAYWOOD, ILLINOIS

UNIVERSITY OF CALIFORNIA PUBLICATIONS IN PUBLIC HEALTH

Volume 1, No. 2, pp. 15-245

Issued November 17, 1928

UNIVERSITY OF CALIFORNIA PRESS

BERKELEY, CALIFORNIA

---

CAMBRIDGE UNIVERSITY PRESS

LONDON, ENGLAND

# CONTENTS

	PAGE
Introduction.....	15
Derivation of the most important equations.....	23

## I

### CLASS 1—SIMPLE PROCESS.

GROUP 1—The heating curve is a simple logarithmic curve.

Alphabetical list of symbols.....	39
-----------------------------------	----

## PROBLEMS:

### I—CALCULATION OF LENGTH OF PROCESS.

I-A	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	47
I-B	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	48

### II—CALCULATION OF A PROCESS EQUIVALENT TO A GIVEN PROCESS AT A DIFFERENT RETORT TEMPERATURE

II-A	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	50
II-B	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	52

### III—CALCULATION OF EFFECT OF CHANGE IN INITIAL TEMPERATURE UPON THE TIME NECESSARY FOR STERILIZATION.

III	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can has any value.....	53
-----	--	----

### IV—CALCULATION OF TIME NECESSARY TO REACH A GIVEN TEMPERATURE AT CENTER OF CAN.

IV	Difference between retort temperature and the given temperature at center of can has any value.....	54
----	---	----

### V—CALCULATION OF TEMPERATURE ATTAINED AT CENTER OF CAN IN A GIVEN LENGTH OF TIME.

V	Difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period of time has any value.....	54
---	--	----

### VI—CALCULATION OF THE AMOUNT OF LETHAL HEAT AT CENTER OF CAN UP TO A GIVEN TIME, EXPRESSED AS PERCENTAGE OF HEAT NECESSARY TO STERILIZE.

VI-A	Difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period of time is not less than $0.1^{\circ}$ .....	55
VI-B	Difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period of time is less than $0.1^{\circ}$ .....	57



## II

### CLASS 1—SIMPLE PROCESS

#### GROUP 2—There is a break in the heating curve.

	PAGE
Alphabetical list of symbols.....	59

### PROBLEMS

#### VII—CALCULATION OF LENGTH OF PROCESS.

VII-A	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	76
VII-B	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	78

#### VIII—CALCULATION OF A PROCESS EQUIVALENT TO A GIVEN PROCESS AT A DIFFERENT RETORT TEMPERATURE.

VIII-A	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	81
VIII-B	Difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	86

#### IX—CALCULATION OF EFFECT OF CHANGE IN INITIAL TEMPERATURE UPON THE TIME NECESSARY FOR STERILIZATION.

IX-A	The time of occurrence of break is given, and the difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	91
IX-B	The time of occurrence of break is given, and the difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	95
IX-C	The temperature at center of can when break occurs is given, and is higher than either initial temperature; and the difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can has any value.....	100
IX-D	The temperature at center of can when break occurs is given, and is lower than the initial temperature of can in process to be calculated; and the difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can has any value.....	101
IX-E	The temperature at center of can when break occurs is given and is lower than the initial temperature of can in the given process; and the difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can has any value.....	102

#### X—CALCULATION OF TEMPERATURE ATTAINED AT CENTER OF CAN IN A GIVEN LENGTH OF TIME.

X-A	The time of occurrence of break is given, and the difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period of time has any value.....	103
X-B	The temperature at center of can when break occurs is given, and the difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period of time has any value.....	104

## PROBLEMS

### X—CALCULATION OF TIME NECESSARY TO REACH A GIVEN TEMPERATURE AT CENTER OF CAN.

PAGE

XI-A	The time of occurrence of break is given, and the difference between retort temperature and the given temperature at center of can has any value.....	105
XI-B	The temperature at center of can when break occurs is given, and the difference between retort temperature and the given temperature at center of can has any value.....	106

### XII—CALCULATION OF THE AMOUNT OF LETHAL HEAT AT CENTER OF CAN UP TO A GIVEN TIME, EXPRESSED AS PERCENTAGE OF THE HEAT NECESSARY TO STERILIZE.

XII-A	Difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period of time is not less than $0.1^{\circ}$ .....	108
XII-B	Difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period of time is less than $0.1^{\circ}$ .....	111

## III

### CLASS 2—DIVIDED PROCESS.

GROUP 1—The heating curve is a simple logarithmic curve.

Alphabetical list of symbols.....	115
-----------------------------------	-----

### XIII—CALCULATION OF LENGTH OF PROCESS.

XIII-A	The time of occurrence of change in retort temperature is given, and the difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	131
XIII-B	The time of occurrence of change in retort temperature is given, and the difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	133
XIII-C	The temperature at center of can at time of change is retort temperature is given, and the difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	135
XIII-D	The temperature at center of can at time of change in retort temperature is given, and the difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	137

### XIV—CALCULATION OF DIVIDED PROCESS EQUIVALENT TO A GIVEN SIMPLE PROCESS AT ANY RETORT TEMPERATURE.

XIV-A	Difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	139
XIV-B	Difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	142

### XV—CALCULATION OF A DIVIDED PROCESS EQUIVALENT TO A GIVEN DIVIDED PROCESS AT DIFFERENT RETORT TEMPERATURES.

XV-A	Difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	146
XV-B	Difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than $0.1^{\circ}$ .....	149

### XVI—CALCULATION OF EFFECT OF CHANGE IN INITIAL TEMPERATURE UPON THE TIME NECESSARY FOR STERILIZATION.

XVI-A	The time of occurrence of change in retort temperature is given, and the difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than $0.1^{\circ}$ .....	154
-------	---	-----

XVI-B	The time of occurrence of change in retort temperature is given, and the difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than 0.1°.....	157
XVI-C	The temperature at center of can at time of change in retort is given, and the difference between final retort temperature and the maximum temperature attained at center of can has any value.....	161

XVII—CALCULATION OF TEMPERATURE ATTAINED AT CENTER OF  
CAN IN A GIVEN LENGTH OF TIME.

XVII-A	The temperature at center of can at time of change in retort temperature is given, and the difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period has any value.....	162
XVII-B	The time of occurrence of change in retort temperature is given and the difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can in the given period has any value.....	163

XVIII—CALCULATION OF TIME NECESSARY TO REACH A GIVEN  
TEMPERATURE AT CENTER OF CAN.

XVIII-A	The temperature at center of can at time of change in retort temperature is given, and the difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period has any value.....	165
XVIII-B	The time of occurrence of change in retort temperature is given, and the difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period has any value.....	166

XIX—CALCULATION OF THE AMOUNT OF LETHAL HEAT AT CENTER OF  
CAN UP TO A GIVEN TIME, EXPRESSED AS PERCENTAGE OF  
THE HEAT NECESSARY TO STERILIZE.

XIX-A	Difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period is not less than 0.1°.....	167
XIX-B	Difference between retort temperature and the temperature attained at center of can in the given period is less than 0.1°.....	170

IV

CLASS 2—DIVIDED PROCESS  
GROUP 2—There is a break in the heating curve.

XX	Calculation of length of process.....	173
XXI	Calculation of a divided process equivalent to a given divided process at different retort temperatures and different initial temperature.....	178

APPENDIX.....	185
---------------	-----

SOLUTIONS IN TABULAR FORM.....	185
--------------------------------	-----

Problems	I-A—VI-B	XIII-A—XIV-B
	VII-A—IX-B	XV-A—XVI-C
	IX-C—XII-B	XVII-A—XIX-B

TABLE Z: Index numbers and <i>j</i> values.....	187
CHARTS and Auxiliary Tables.....	193

# MATHEMATICAL SOLUTION OF PROBLEMS ON THERMAL PROCESSING OF CANNED FOOD

---

## INTRODUCTION

1. The lengths of time necessary to destroy bacterial spores by subjecting them to heat at various temperatures in media under given conditions are called the thermal death times for these spores.

The rate of heat penetration of a can of food is the rate of rise in temperature of the center of the contents during the heating of the can held in a medium at constant temperature and the rate of drop in temperature of the center of the contents during the cooling of the can held in a medium at constant temperature.

By correlating thermal death times with the rate of heat penetration, the length of time theoretically necessary to destroy any specific bacterial spores present in the canned food can be calculated for any given temperature of process. These theoretical lengths of process will be the actual lengths of process necessary provided all conditions are given absolutely accurate control.

In a previous paper,<sup>1</sup> a formula, which is expressed in the form  $C = \frac{t}{f_h}$ , was developed for obtaining the necessary length of process of a can of food under certain conditions, which may be called the ideal conditions. These include the following:

(1) The curve which represents the death times of the spores corresponding to different temperatures must apply to conditions as to bacterial media which exist within the can during the process, and must represent a simple logarithmic function; therefore must be a straight line when plotted on semi-logarithmic paper.

(2) The curves which represent the rate of heating and the rate of cooling of the can of food, except the first part of each,<sup>2</sup> must represent simple logarithmic functions, and therefore must be straight lines when plotted on semi-logarithmic paper and both must have the same slope.

The formula is applicable to all retort temperatures, all initial temperatures, all temperatures of cooling water, and all slopes of thermal death time and heating curves.

---

<sup>1</sup> Ball, C. O., Thermal process time for canned foods, Bulletin of the National Research Council, No. 37, Oct., 1923.

<sup>2</sup> The first part of the heating curve represents a lag in the rise of temperature and the first part of the cooling curve represents a corresponding lag in the drop of temperature. Such a lag is present until the necessary temperature gradient between the outside and the center of the contents of the can is established, which makes possible the normal logarithmic rate of change of temperature at the center.



In the application of the formula the length of process is found by first obtaining the difference in degrees which will exist between the retort temperature and the maximum temperature which must be attained by the center of the can during the minimum process which will destroy the spores. This difference in temperature is symbolized by  $g$ . By simply referring this value of  $g$  to the heating curve, the length of process is read directly from this curve.

The formula was extended, in section VI of the paper cited above, to apply to certain deviations from the ideal conditions relating to the heating and cooling curves.

2. In the present treatise are given specific calculations involved in the application of the principles which are considered theoretically in the earlier paper. The purpose of this work is to present, in as simple a manner as possible, rapid methods of solving problems of heat penetration and of processing time for canned foods. The theoretical nature of this work must be strongly emphasized, and it must be borne in mind that a result obtained in any instance is applicable only to the particular conditions assumed in the problem. For instance, in problem VI-B, it is found that a process of 15 minutes at  $255^{\circ}$  imparts to the center of a No. 2 can only 96 per cent of the amount of lethal heat necessary to sterilize. This is because an extremely resistant organism is assumed to be present, as is shown by the high value of  $F$ .

Sample problems are solved in numbered steps, and directions for using the charts are given in these solutions. The problems include: (1) calculation of process time for given conditions; (2) calculation of equivalent processes; (3) calculation of temperature reached in center of can in a given time; (4) calculation of the time necessary to reach a given temperature in the center of the can; and (5) calculation of the amount of lethal heat reaching the center of the can up to a given time, expressed as percentage of the total heat necessary to sterilize.

3. An attempt has been made to make the steps in the solution of each example simple and clear, in the hope that the charts and methods will be serviceable to anyone, even though he lack mathematical aptitude. In addition to the descriptive solutions of the problems, a tabulated solution of each problem except problems XX and XXI is given in the Appendix. These tabulated solutions are schemes, which should be followed in applying the methods that are presented. They are of value also in that they show clearly the relation existing between the different methods.

4. The problems are divided into two main classes: (1) problems involving only simple processes, viz., processes in which only one processing temperature is used; (2) problems involving divided processes, viz., processes in which two processing temperatures are used; in other words, processes in which the processing temperature is either raised or lowered at some instant during the progress of the process. The problems falling under each of these classes are subdivided into two groups. In the first group, the heating curves involved are straight lines when plotted on semi-logarithmic paper. In the second group, the heating curves involved are each broken at some point, i. e., they suffer a change of slope. Under this classification, the problems are grouped as follows:

- Class 1, Group 1. Problems 1-A to VI-B, inclusive.
- Class 1, Group 2. Problems VII-A to XII-B, inclusive.
- Class 2, Group 1. Problems XIII-A to XIX-B, inclusive.
- Class 2, Group 2. Problems XX and XXI.

5. In order to obtain the value of  $f_h$ , if the heating curve itself is not available, the index number for the product must be known. Space is allowed in table Z, pp. 1Z-4Z of the Appendix, for the insertion of the index numbers of a large number of products. These values, as well as the values of the quantity,  $j$ , are obtained from the heat penetration curves for the products. As they have not as yet been established for most products, it is left for the reader to obtain these values later from the proper sources. They will be supplied to those interested by research laboratories connected with the canning industry as soon as they have been established.

The index number of a product varies according to the method of processing used; i. e., according to whether the can is stationary or in motion during the process and, if in the latter state, according to the nature and velocity of the motion. Many products also have varying index numbers and  $j$  values, depending on the method followed in preparing the material. Space is allowed in table Z for one index number and one value of  $j$  for each food listed. These should be understood to be the values applying to the food prepared in the manner commonly used, and given a stationary process.

Index numbers for peas and cream style corn are given in a number of the problems. These are given in the realization that, although considerable studies of heat penetration into corn and peas have been made, the numbers may even yet be changed. Their use in this treatise was prompted by a desire to make the presentation as clear as possible by the direct application of some of the methods to well-known canned products. Herein, index numbers are used only in connection with logarithmic curves which do not break. The reader is again cautioned that, when he obtains a value of  $f_h$  from chart 1 by the use of an index number, that value is purely theoretical. The relationship shown on chart 1 between cans of different sizes does not hold for all products. It holds approximately for many products, however, especially for those having the lower rates of heat penetration.

In all solutions except those of problems XX and XXI, the value of  $j$  for the cooling curve is assumed to be 1.41. This is true even though the value of  $j$  for the heating curve (given in specifications of the problem) may be different from 1.41; for the factor,  $C$ , which is used in the development of the methods, automatically gives this value to  $j$  for the cooling curve. This, of course, introduces an error into the calculations under certain conditions. Should it be desired to use, for  $j$  of the cooling curve, a value other than 1.41, the methods of problems XX and XXI must be followed.

6. The value,  $f_h$ , is defined on pages 4-W and 7-Y as representing the slope of the heating curve. Similarly, the value,  $z$ , is defined as representing the slope of the thermal death time curve. These values are not the true slope values of the respective curves; but they are such functions of the true slope values that,

when they are known, along with the coordinates of one point on each curve, it is possible to plot the curves on semi-logarithmic paper. In the case of the heating curve, the value of  $jI$ , by definition, locates a point. Similarly, in the case of the thermal death time curve, the value of  $F$ , by definition, locates a point. Thus, the value of  $f_h$ , with the value of  $jI$  identifies a simple heating curve; and the value of  $z$  with the value of  $F$  identifies a thermal death time curve. The true slope of the heating curve is given by the expression,  $2.3026 \frac{y_h}{f_h}$ , while the true slope of the thermal death time curve is given by the expression,  $2.3026 \frac{y_0}{z}$ .

The symbol,  $y_h$ , represents degrees of temperature measured downward from retort temperature. The symbol,  $y_0$ , represents minutes required to destroy the organism.

7. The method of solving a problem in which the difference between the maximum temperature attained in the center of the can and final retort temperature is less than  $0.1^\circ$  is different from the method used when the difference between the maximum temperature attained and final retort temperature is not less than  $0.1^\circ$ . Both methods are presented for each type of problem solved. Since the maximum temperature is not known until a large part of the solution of the problem has been accomplished, the question as to whether the difference between this temperature and retort temperature will be less than or greater than  $0.1^\circ$  is a matter of conjecture when the solution of the problem is begun. For this reason, one may embark upon the wrong method at the outset. This will not cause unnecessary work, however, because cross-reference notes are inserted between steps in the solutions, and these notes will direct the worker to change to the proper method as soon as it is learned that the maximum temperature is not as it had been assumed to be. The work already done in calculating the steps preceding the notes is not wasted, as these steps apply to either method. For instance, assume that the problem is to calculate a simple process for a product having a broken heating curve. In this process, the maximum temperature attained at center of can is less than  $0.1^\circ$  below retort temperature; but we shall assume that the worker starts the solution by the method of problem VII-A, which is a method intended to be used when the maximum temperature at center of can does not get as close as  $0.1^\circ$  to retort temperature. Upon completing step 30, he finds a value of  $\frac{F_{hh}}{U}$  less than 0.575, and he is directed by note E to change to the method of problem

VII-B to complete the solution. Since steps 1-30, which precede note E in problem VII-A are completely analogous to steps 1-29, which precede note E in problem VII-B, no work is wasted because of the choice of the wrong method. This is clearly shown in the tabulated solutions given in the Appendix.

8. In solving problems for equivalent processes, quite often no particular organism is specified; or, for some other reason, the proper value of  $z$  is not known. In such a case, a value of  $z$  must be assumed. The result of the calculation will depend, to some extent, upon the choice of this value. No established rule can be given to govern the choice of a value of  $z$ . The proper value depends upon a large number of factors, most of which are not, as yet, well understood. Acidity



is one of the most important of the factors, however, and the general statement may be made that the higher the acidity (lower pH value) the greater is the value of  $z$ . For products having pH value between 5.6 and 6.4, the value of  $z$  is generally taken as 18°. A study of table 1 will give the reader a concrete conception of the variation in equivalent process values obtained by methods of problems II-A and II-B when different values of  $z$  are used. For an assumed process of 85 minutes at 250°, equivalent processes at 260° are given, calculated for five different values of  $z$ ; viz., 6°, 12°, 18°, 22°, and 26°, when  $f_h$  equals 50 minutes and 100 minutes. Similar values are given for an assumed process of 150 minutes at 250° when  $f_h$  equals 150 minutes and 200 minutes. It is noted that, for the three highest values of  $f_h$  given, greater difference in calculated results is found when the value of  $z$  varies from 6° to 12° than when it varies from 12° to 26°.

TABLE 1

Given process at 250° (minutes)	$f_h$	$z$	Equivalent process at 260° (minutes)
85	50	6	57.3
		12	59.2
		18	60.9
		22	62.4
		26	63.7
	100	6	61.3
		12	70.7
		18	71.6
		22	71.8
		26	72.3
150	150	6	110.0
		12	124.3
		18	127.6
		22	128.5
		26	131.4
	200	6	119.4
		12	135.5
		18	139.5
		22	140.2
		26	141.5

If the thermal death time curve is not a straight line curve on semi-logarithmic paper, none of the solutions given herein can be used without alteration. A problem involving a thermal death time curve of this type must be solved by the original method described by Bigelow, *et al.* on pages 119–126, Bulletin No. 16L, National Canners Association, 1920.

9. Although definitions of the symbols are given, the solutions of the problems are presented in such a way that it is not absolutely essential that these definitions be understood before problems can be solved. An explanation of the meaning and the use of many of the symbols, and the development of charts 1, 2, 3, 4, and 6 are presented in the Bulletin of the National Research Council, No. 37.

10. The cross-reference notes inserted between steps in the different solutions are for the purpose of guiding the worker in case trouble is encountered or in case



irregularities are present which cannot be disposed of by following the standard method being used. The notes need not be heeded as long as the solution proceeds smoothly.

11. Accompanying each chart is a table giving relative values taken from the curves of the chart. These tables are given because some workers find themselves able to solve the problems more easily by taking values from tables than from curves.

In certain instances, the tables may not agree strictly with the charts to which they belong. For instance, a slight disagreement exists between Table 3-C and Chart 3. In such cases, the tables should be taken as correct. The disagreements were caused by errors in plotting the curves of the charts.

The problems in this paper were solved before the tables had been compiled. Values were, therefore, taken from the charts. Slight errors may appear in the solutions due to the fact that one cannot take values from the charts as accurately as he can from the tables, also due to discrepancies between the charts and the tables. It is felt that an error of this nature is insignificant when the ultimate results are considered, since, in terms of process time, it amounts to only a small fraction of a minute.

12. A large number of subscripts are used to distinguish from one another symbols which have similar applications under slightly different conditions. The meanings of these subscripts are explained in the definitions of the symbols. In using the various charts, do not be confused by the subscripts. If a chart scale is designated only by the principal character of a group of symbols which have this character in common, the scale so designated applies to all the symbols in this group. For instance, a scale marked " $g$ " applies to any symbol that has  $g$  for its principal character—no matter what the subscript may be. Given the value of a quantity  $g_{bh}$ , and applying this value to chart 5 in order to find a value on the scale marked " $Y_{220}$ ," the value of the quantity found would be designated by the symbol,  $Y_{220bh}$ .

13. The heating curve applying to each problem solved is plotted on either chart 7 or chart 8, both on semi-logarithmic paper and on squared coordinate paper. The cooling curves for problems I-A to XIX-B, inclusive, are not plotted because it is thought that they would cause confusion in the interpretation of the curves. It is considered desirable to show on the same chart all of the different heating curves falling under one class of problems. In this way, a better idea is given of the variety of heating conditions which are treated and of the scope of the work presented, than would be conveyed by plotting the curves in smaller groups, as would be necessary if the cooling curves were shown.

Chart 7 shows the curves belonging to the problems of class 1; chart 8 shows the curves belonging to the problems of class 2. Each of the charts is divided into four sections; A, A', B, B' respectively. Sections A and A', in each case, show the curves for problems in which the difference between retort temperature and the maximum temperature attained in center of can is not less than  $0.1^\circ$ . Section A shows the curves plotted to ordinary linear rectangular coordinates; section A' shows the curves plotted on semi-logarithmic paper. Sections B and B', in each case, show the curves for problems in which the difference between

retort temperature and the maximum temperature attained in center of can is less than 0.1°. Section B shows the curves plotted to ordinary linear rectangular coordinates; section B' shows the curves plotted on semi-logarithmic paper.

14. For all calculations in which the effect of cooling is considered, it is assumed that the cooling is done in water. When air cooling is used, the lethal value of the cooling period is greater than it is when water cooling is used. Since little has been done in the study of air-cooling, there is not sufficient information on the relative lethal values of air-cooling versus water-cooling to make it possible to use methods such as I-A to XIX-B, inclusive, in solving problems involving air-cooling. Experimentally determined cooling curves must be available for use in solving such problems, and the solutions should be made by the methods of problems XX and XXI.

15. No method is given for the direct calculation of the amount of lethal heat effective in one process expressed in terms of a percentage of the amount effective in another process. Obviously such a problem can be solved by first finding the value of *F* for the given process in terms of which the value of the other process is to be expressed. The value of *F* is found by following one of the methods for calculating a process equivalent to a given process. Using this value of *F*, the percentage value desired is obtained by following one of the methods for calculating the amount of lethal heat at the center of the can. For instance, steps 1 to 32, inclusive, of problem VIII-A, followed by problem VI-A, will give the amount of lethal heat effective in a simple process when the heating curve is a simple logarithmic curve expressed in terms of a percentage of the amount of lethal heat effective in a given simple process in which there is a break in the heating curve.

16. It is necessary in some problems to deal with negative logarithms, and sometimes to obtain the anti-logarithm of a negative number. This is the case if a negative value is obtained in any of the calculations signified in the following list:

Problem	Step	Problem	Step
VIII-A	11	XV-B	14 or 31
VIII-B	11 or 26	XVI-A	15
IX-A	11	XVI-B	16 or 33
IX-B	11 or 26	XX	5
XV-A	14	XXI	5

It must be remembered that, in order to get from a table the anti-log of a negative logarithm, the mantissa, or portion to the right of the decimal point, of the latter, must be expressed in positive form, while the characteristic, or portion to the left of the decimal point, is a negative quantity. This is most easily done by subtracting the absolute value of the mantissa from 1, giving the result a positive sign and adding 1 to the absolute value of the characteristic, which retains the negative sign, for example:

$$\begin{aligned} -1.256 &= -1 + (-.256) \\ &= (-1 - 1) + [(-.256) + 1] \\ &= -2 + .744 \end{aligned}$$

The last value, as a logarithm, is usually written  $\bar{2}.744$ .

The significant figures of the anti-log are obtained in the ordinary manner by referring the mantissa to a table of logarithms, and the number of ciphers to the right of the decimal point, which precede the significant figures is equal to the number of units in the negative characteristic.

For example:

$$\text{Log}^{-1} \bar{2}.744 = 0.00555$$

17. All the calculations in the following problems are based on the assumption of instantaneous rise of the retort to processing temperature. Consideration for the effect of "coming-up time" may be made on the basis of the principles discussed on pp. 45-48, Bull. 37, N. R. C., cited in paragraph 1, above. Because of variation in the rate of rise of temperature of the retort (discussed in connection with fig. 12, Bull. 37), it is considered better to calculate the effect of variation in "coming-up time" upon a result than to calculate processes from heating curves obtained in heat penetration tests in which different lengths of "coming-up time" were used, unless perfect control in the rate of rise of retort temperature is maintained in the experiments.

18. It will be observed that, in a few instances, a symbol in this paper has the same meaning as a different symbol in Bulletin 37, N. R. C. This situation is brought about mainly through the adoption of different meanings for prime symbols and subscripts than were used in Bulletin 37. In table 2, symbols in the same horizontal line have the same meaning. In the first column the symbols are those used in this paper; in the second column are those used in Bulletin 37.

TABLE 2

Symbols used herein	Symbols used in Bulletin 37
Subscript ( $a$ )	Single Prime ( $'$ )
Subscript ( $_{bh}$ )	Subscript ( $_b$ )
Subscript ( $_{h2}$ )	Subscript ( $_2$ )
$A_{cbh}$	$A_{1h}$
$A_{bh}$	$A''$
$B_B$	$B$
$V_h$	$V$

Two other symbols,  $W$  and  $X$ , are used with different meanings in the two papers.

19. The most important equations used in the calculations—twenty-six in number—are given below. The numbers of the problems in which each equation appears are given, and also the derivation of each equation from equations appearing in Bulletin 37.

20. Valuable assistance was rendered by Dr. F. F. Fitzgerald of this laboratory in planning the introductory material, and by Mr. H. P. Stevens, also of this laboratory, in compiling tables 5-C and 6-C.

## THE MOST IMPORTANT EQUATIONS

EQ. (1): [PROBLEMS I-B, II-B]

$$B_B = B'' + U - f_h T \quad (1)$$

Derived from eq. (36), p. 43, Bull. 37.

$B''$  = number of minutes required for temperature at center of can to reach  $0.1^\circ$  below retort temperature.

Thus it is evident that

$$B_B = B'' + h \quad (1A)$$

By eq. (36), Bull. 37,

$$h = t'_{.1} - f_h C'_{.1} \quad (1B)$$

By virtue of lethal heat values expressed on p. 43, Bull. 37,

$$t'_{.1} = U, \text{ or } t_{.1} = U \quad (1C)$$

$T$  is merely a symbol used in lieu of  $C'_{.1}$ . The values of  $T$  given in table 1B, herein, are taken directly from table 1A, Bull. 37.

Thus

$$h = U - f_h T \quad (1D)$$

and

$$B_B = B'' + U - f_h T \quad (1)$$

EQ. (2): [PROBLEM II-B]

$$U_a = B_{Ba} - B_a'' + f_{ha} T_a \quad (2)$$

Converting eq. (1) to apply to a known process,

$$B_{Ba} = B_a'' + U_a - f_{ha} T_a \quad (2A)$$

Transposing eq. (2A), we obtain eq. (2).

EQ. (3): [PROBLEM VI-A]

$$P'_c = 100A'_c = 100 \frac{f_h}{F} Y' \quad (3)$$

From eq. (3), we have

$$A'_c = \frac{f_h}{F} Y' \quad (3A)$$

By virtue of eq. (17a), p. 30, Bull. 37, and by definitions of  $A'$  and  $Y'$ , the general equation for  $Y'$  is

$$Y' = \frac{\rho' C'}{t'} \text{ when } F = 1 \quad (3B)$$



Defining  $g'_F$  by the equation,

$$g'_F = 250^\circ - g' \quad (3C)$$

we may substitute  $-g'_F$  for  $x_0$  and  $F$  for  $y_0$  in eq. (4), p. 17, Bull. 37:

$$\frac{-g'_F}{z} = \log \frac{F}{t'} \quad (3D)$$

Changing signs in eq. (3D)

$$\frac{g'_F}{z} = \log \frac{t'}{F} \quad (3E)$$

Solving eq. (3E) for  $t'$ ,

$$t' = F 10^{\frac{g'_F}{z}} \quad (3F)$$

Substituting from eq. (3F) into eq. (3B)

$$Y' = \frac{\rho' C'}{\frac{g'_F}{F 10^{\frac{g'_F}{z}}}} \text{ when } F = 1 \quad (3G)$$

By eq. (3G), we may obtain the general equation for  $Y'$  by giving  $F$  in eq. (3G) the value, unity,

$$Y' = \frac{\rho' C'}{\frac{g'_F}{10^{\frac{g'_F}{z}}}} \quad (3H)$$

Substituting eq. (3F) into eq. (3H), we obtain

$$Y' = \frac{F \rho' C'}{t'} \quad (3I)$$

Equation (52), p. 66, Bull. 37, is put into general form by a substitution of subscripts, as follows:

$$A'_c = \frac{f_h \rho' C'}{t'} \quad (3J)$$

Dividing eq. (3I) by  $F$ ,

$$\frac{\rho' C'}{t'} = \frac{Y'}{F} \quad (3K)$$

Substituting from eq. (3K) into eq. (3J), we obtain eq. (3A).

Eq. (4): [PROBLEM VI-A]

$$P' = 100 A' = 100 \frac{f_h Y'}{F \rho'} \quad (4)$$

From eq. (4), we have

$$A' = \frac{f_h Y'}{F \rho'} \quad (4A)$$

substituting eq. (3I) into eq. (4A),

$$\begin{aligned} A' &= \frac{f_h}{F\rho'} \left( \frac{F\rho'C'}{t'} \right) \\ &= \frac{f_h C'}{t'} \end{aligned} \quad (4B)$$

which is eq. (17a), p. 30, Bull. 37.

Eq. (5): [PROBLEM VI-B]

$$P'_{c<.1} = 100A'_{c<.1} = 100 \left[ \frac{f_h Y'_{.1}}{F} + \frac{B'_{<.1}}{U} \right] \quad (5)$$

From eq. (5) we have

$$A'_{c<.1} = \frac{f_h Y'_{.1}}{F} + \frac{B'_{<.1}}{U} \quad (5A)$$

From general eq. (3I)

$$Y'_{.1} = \frac{F\rho_{.1}C'_{.1}}{t'_{.1}} \quad (5B)$$

By eq. (1C),

$$t'_{.1} = U \quad (1C)$$

Eq. (35), p. 43, Bull. 37, is generalized by substituting  $A'_{<.1}$  for 1 and  $B'_{<.1}$  for  $h$  (see definition of  $B'_{<.1}$  on page 2W, and as expressed mathematically in steps 5, 6, 7, and 13, problem VI-B)

$$A'_{<.1} = \frac{f_h C'_{.1}}{t'_{.1}} + \frac{B'_{<.1}}{t'_{.1}} \quad (5C)$$

By definition of  $A'_{.1}$  and eq. (4B);

$$A'_{.1} = \frac{f_h C'_{.1}}{t'_{.1}} \quad (5D)$$

Substituting eq. (5D) into eq. (5C),

$$A'_{<.1} = A'_{.1} + \frac{B'_{<.1}}{t'_{.1}} \quad (5E)$$

By definition, the only difference between the value of  $A'_{<.1}$  and that of  $A'_{c<.1}$  lies in the fact that the former includes the cooling portion of the process while the latter does not. Since, in the right-hand member of eq. (5E), the effect of the cooling portion is entirely included in the value of  $A'_{.1}$ , it is evident that a change of the first term alone from  $A'_{.1}$  to  $A'_{c<.1}$  will change the value of this member from that of  $A'_{<.1}$  to that of  $A'_{c<.1}$ . Thus,

$$A'_{c<.1} = A'_{c<.1} + \frac{B'_{<.1}}{t'_{.1}} \quad (5F)$$

By definition of  $A'_{c.1}$  and eq. (3J),

$$A'_{c.1} = \frac{f_h \rho_{.1} C'_{.1}}{t'_{.1}} \quad (5G)$$

Substituting eq. (5G) into eq. (5F),

$$A'_{c.<.1} = \frac{f_h \rho_{.1} C'_{.1}}{t'_{.1}} + \frac{B'_{<.1}}{t'_{.1}} \quad (5H)$$

Substituting eqs. (5B) and (1C) into eq. (5H),

$$A'_{c.<.1} = \frac{f_h Y'_{.1}}{F} + \frac{B'_{<.1}}{U},$$

which is identical to eq. (5A).

Eq. (6): [PROBLEM VI-B]

$$P'_{<.1} = 100 A'_{<.1} = 100 \left[ \frac{f_h Y'_{.1}}{F \rho_{.1}} + \frac{B'_{<.1}}{U} \right] \quad (6)$$

From eq. (6), we have

$$A'_{<.1} = \frac{f_h Y'_{.1}}{F \rho_{.1}} + \frac{B'_{<.1}}{U} \quad (6A)$$

Substituting eq. (5B) into eq. (6A),

$$A'_{<.1} = \frac{f_h C'_{.1}}{t'_{.1}} + \frac{B'_{<.1}}{t'_{.1}} \quad (6B)$$

This is identical to eq. (5C).

Eq. (7): [PROBLEMS VII-A, VII-B, VIII-A, VIII-B, IX-A, IX-B]

$$\left. \begin{aligned} V_h &= 1 + \theta_\epsilon \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) \\ \text{or} \quad V_h &= 1 + \theta_{\epsilon.<.1} \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) \end{aligned} \right\} \quad (7)$$

From eq. (54), p. 67, Bull. 37, by substitution of subscripts to conform to present definitions,

$$A'_{h2} = \frac{f_2 C_{h2}}{t'_{h2}} + \rho'_{bh} \frac{(f_{h1} - f_2) C'_{bh}}{t'_{bh}} \quad (7A)$$

From p. 69, Bull. 37, substituting  $V_h$  for  $V$ , (see par. 18, Introduction) we obtain

$$V_h = 1 - \rho'_{bh} \frac{(f_{h1} - f_2) C'_{bh}}{t'_{bh}} \quad (7B)$$

$$= 1 - \frac{\rho'_{bh} C'_{bh}}{t'_{bh}} (f_{h1} - f_2) \quad (7C)$$

From general eq. (3I) and eq. (7C)

$$V_h = 1 - \frac{Y'_{bh}}{F}(f_{h1} - f_2) \quad (7D)$$

$$= 1 + \frac{Y'_{bh}}{F}(f_2 - f_{h1}) \quad (7E)$$

The factor,  $\theta_\epsilon$ , was neglected in Bull. 37 and its omission makes no difference in the results of the majority of calculations. When a calculated process terminates very soon after the point of break in heating curve, however, the results become confusing without the use of this factor, as there is a discontinuity in lethal heat values at the point of break.

Inserting the factor  $\theta_\epsilon$  arbitrarily, as coefficient of the terms concerned with the point of break in heating curve, we have

$$V_h = 1 + \theta_\epsilon \frac{Y'_{bh}}{F}(f_2 - f_{h1}) \quad (7F)$$

The formula for  $\theta_\epsilon$  is entirely empirical and is given such form that the following statements are true:

1. When the calculated process terminates at the point of break in heating curve,  $\theta_\epsilon$  has the value  $\frac{1}{\rho_{bh}}$ .

2. As the calculated processes become longer, i.e., as the terminal points of the processes fall after the point of break in heating curve, the value of  $\theta_\epsilon$  rapidly approaches unity.

#### CASE 1

In the first case  $\left(\theta_\epsilon = \frac{1}{\rho_{bh}}\right)$ , when  $\theta_\epsilon$  is placed as a coefficient of the last term of eq. (7C), we have

$$V_h = 1 - \frac{C_{bh}}{t_{bh}}(f_{h1} - f_2) \quad (7G)$$

Substituting this value of  $V_h$  for  $V$  in eq. (56), p. 69, Bull. 37, and rearranging, we obtain

$$C_{h2} = \frac{t_{h2}}{f_2} \left( 1 - \frac{(f_{h1} - f_2)C_{bh}}{t_{bh}} \right) \quad (7H)$$

But, under the condition given,

$$C_{h2} = C_{bh} \text{ and } t_{h2} = t_{bh}$$

Therefore, we obtain from eq. (7H),

$$\frac{f_{h1}C_{bh}}{t_{bh}} = 1 \quad (7I)$$

which is of the form of eq. (17b), p. 30, Bull. 37. Thus, we see that, when the calculated process terminates at the point of break in heating curve, the factor  $\theta_\epsilon$  places the process onto the basis of one for which the cooling curve has the same slope as the first part of the heating curve, viz.,  $f_{h1}$ .



## CASE 2

In the second case, when  $\theta_e$  has substantially the value, 1, it is seen that  $\theta_e$  does not effect the value of  $V_h$ , and the cooling curve is considered to have the same slope as the final part of the heating curve, viz.,  $f_2$ , as explained on p. 67, Bull. 37.

EQ. (8): [PROBLEMS VII-A, VIII-A, VIII-B, IX-A]

$$x_{ch} = f_2 \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} \quad (8)$$

Eq. (8) is obtained directly from eq. (1), p. 13, Bull. 37, by making the following substitutions of symbols:

$$\begin{array}{ll} x_{ch} \text{ for } x_h & g'_{bh} \text{ for } y_h \\ f_2 \text{ for } f_h & g_{h2} \text{ for } g \end{array}$$

EQ. (9): [PROBLEMS VII-B, IX-B]

$$x_{ch} < .1 = U \left[ 1 + \frac{\theta_e < .1 Y'_{bh} (f_2 - f_{h1})}{F} - \frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} \right] + f_2 (1 + \log g'_{bh}) \quad (9)$$

From eq. (7A), we have

$$A'_{h2} = \frac{f_2 C_{h2}}{t'_{h2}} + \frac{\rho'_{bh} f_{h1} C'_{bh}}{t'_{bh}} - \frac{\rho'_{bh} f_2 C'_{bh}}{t'_{bh}} \quad (9A)$$

From general eqs. (4B) and (3I)

$$A''_{h2} = \frac{f_2 C_{h2}}{t'_{h2}} = \frac{f_2 Y_{h2}}{F \rho_{h2}} \quad (9B)$$

From general eqs. (3J) and (3I)

$$A'_{cbh} = \frac{\rho'_{bh} f_{h1} C'_{bh}}{t'_{bh}} = \frac{f_{h1} Y'_{bh}}{F} \quad (9C)$$

and

$$A'_{cbh2} = \frac{\rho'_{bh} f_2 C'_{bh}}{t'_{bh}} = \frac{f_2 Y'_{bh}}{F} \quad (9D)$$

Substituting eqs. (9B), (9C), and (9D) into (9A).

$$A'_{h2} = A''_{h2} + A'_{cbh} - A'_{cbh2} \quad (9E)$$

For the condition,  $g'_{h2} = 0.1^\circ$ , we have, from eq. (9B),

$$A''_{h2} .1 = \frac{f_2 C_{h2} .1}{t'_{h2} .1} = \frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} \quad (9F)$$

and, when  $g'_{h2} < 0.1^\circ$ , we have, from eq. (5E),

$$A''_{h2} < .1 = A''_{h2} .1 + \frac{B'_{h2} < .1}{t'_{h2} .1} \quad (9G)$$

Applying condition  $g'_{h2} < 0.1^\circ$  to eq. (9E), we obtain

$$A'_{h2} < .1 = A''_{h2} < .1 + A'_{cbh} - A'_{cbh2} \tag{9H}$$

Substituting from eqs. (9F), (9G), (9C), (9D), and (1C), into eq. (9H), we have

$$A'_{h2} < .1 = \frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} + \frac{f_{h1} Y'_{bh}}{F} - \frac{f_2 Y'_{bh}}{F} + \frac{B'_{h2} < .1}{U} \tag{9I}$$

Collecting terms and inserting the factor  $\theta_{\epsilon} < .1$  as coefficient of the terms which are concerned with the point of break in heating curve,

$$A'_{h2} < .1 = \frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} + \frac{\theta_{\epsilon} < .1 Y'_{bh} (f_{h1} - f_2)}{F} + \frac{B'_{h2} < .1}{U} \tag{9J}$$

If we impose the condition that the process is just sufficient for sterilization, eq. (9J) becomes

$$1 = \frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} + \frac{\theta_{\epsilon} < .1 Y'_{bh} (f_{h1} - f_2)}{F} + \frac{h_h}{U} \tag{9K}$$

We make the following substitutions in eq. (1), p. 13, Bull. 37:

$$B'_{bh} \text{ for } x_h$$

$$f_2 \text{ for } f_h$$

$$g'_{bh} \text{ for } y_h$$

$$\text{and } 0.1 \text{ for } g,$$

giving

$$\frac{B'_{bh}}{f_2} = \log \frac{g'_{bh}}{0.1} \tag{9L}$$

from which

$$B'_{bh} = f_2 (1 + \log g'_{bh}) \tag{9M}$$

By definition,

$$x_{ch} < .1 = h_h + B'_{bh} \tag{9N}$$

Solving eq. (9K) for  $h_h$ ,

$$h_h = U \left[ 1 - \frac{\theta_{\epsilon} < .1 Y'_{bh} (f_{h1} - f_2)}{F} - \frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} \right] \tag{9P}$$

Substituting eqs. (9M) and (9P) into eq. (9N), gives eq. (9).

Eq. (10): [PROBLEMS VIII-A, VIII-B, IX-A, IX-B]

$$g_{h2a} = \log^{-1} \left( \log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} \right) \tag{10}$$

Taking log of each member of eq. (10) and transposing,

$$\frac{x_{cha}}{f_{2a}} = \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} \tag{10A}$$

which is eq. (1), p. 13, Bull. 37, after a substitution of symbols.

EQ. (11): [PROBLEMS VIII-A, IX-A]

$$F = \frac{f_{2a} Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} - \theta_a Y'_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) \quad (11)$$

From eqs. (9B), (9C), (9D), and (9E), we have

$$A_{h2} = \frac{f_2 Y_{h2}}{F \rho_{h2}} + \frac{Y'_{bh} (f_{h1} - f_2)}{F} \quad (11A)$$

Imposing the conditions that the process is a given process and just sufficient for sterilization, eq. (11A) becomes

$$1 = \frac{f_{2a} Y_{h2a}}{F \rho_{h2a}} + \frac{Y'_{bha} (f_{h1a} - f_{2a})}{F} \quad (11B)$$

Inserting the factor  $\theta_a$  as coefficient of the terms which are concerned with the point of break in heating curve,

$$1 = \frac{f_{2a} Y_{h2a}}{F \rho_{h2a}} + \frac{\theta_a Y'_{bha} (f_{h1a} - f_{2a})}{F} \quad (11C)$$

solving eq. (11C) for  $F$ , we obtain eq. (11).

EQ. (12): [PROBLEMS VIII-B, IX-B]

$$F = f_{2a} \left[ \frac{Y_{h2.1a}}{\rho_{h2.1a}} - \frac{1 + \log g_{h2.1a}}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_a}{z}} \right] - \theta_{a.1} Y'_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) \quad (12)$$

Solving eq. (9K) for  $U$ ,

$$U = \frac{F h_h}{F - \frac{f_2 Y_{h2.1}}{\rho_{h2.1}} - \theta_{e.1} Y'_{bh} (f_{h1} - f_2)} \quad (12A)$$

Substitutions in eq. (4), p. 17, Bull. 37, give

$$\frac{250^\circ - RT}{z} = \log \frac{U}{F} \quad (12B)$$

From eq. (12B)

$$U = F \left( \log^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z} \right) \quad (12C)$$

From eqs. (12A) and (12C),

$$\frac{F h_h}{F - \frac{f_2 Y_{h2.1}}{\rho_{h2.1}} - \theta_{e.1} Y'_{bh} (f_{h1} - f_2)} = F \log^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z} \quad (12D)$$

Solving eq. (12D) for  $F$ ,

$$F = \theta_{e < .1} Y'_{bh} (f_{h1} - f_2) + \frac{f_2 Y_{h2} .1}{\rho_{h2} .1} + \frac{h_h}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z}} \tag{12E}$$

Substitutions in eq. (1), p. 13, Bull. 37, give

$$\frac{h_h}{f_{2a}} = \log \frac{0.1}{g_{h2} < .1a} \tag{12F}$$

Solving for  $h_h$

$$h_h = -f_{2a} (1 - \log g_{h2} < .1a) \tag{12G}$$

Imposing the condition that the process is a given process; and substituting eq. (12G) into eq. (12E)

$$F = \theta_{a < .1} Y'_{bha} (f_{h1a} - f_{2a}) + f_{2a} \left[ \frac{Y_{h2} .1a}{\rho_{h2} .1a} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_a}{z}} \right] \tag{12H}$$

which is eq. (12).

Eq. (13): [PROBLEM XII-A]

$$P'_{ch2} = 100 A'_{ch2} = 100 \frac{f_{h1} Y'_{bh} + f_2 (Y_{h2} - Y'_{bh})}{F} \tag{13}$$

From eq. (13), we have

$$A'_{ch2} = \frac{f_{h1} Y'_{bh}}{F} + \frac{f_2 Y_{h2}}{F} - \frac{f_2 Y'_{bh}}{F} \tag{13A}$$

By definition, the only difference between the value of  $A'_{h2}$  and  $A'_{ch2}$  lies in the fact that the former includes the cooling portion of the process while the latter does not. Since, in the right-hand member of eq. (9E), the effect of the cooling portion is entirely included in the value of  $A''_{h2}$ , it is evident that a change of the first term alone from  $A''_{h2}$  to  $A'_{ch2}$  will change the value of this member from that of  $A'_{h2}$  to that of  $A'_{ch2}$ .

Thus,

$$A'_{ch2} = A''_{ch2} + A'_{cbh} - A'_{cbh2} \tag{13B}$$

From general eqs. (3I) and (3J),

$$A''_{ch2} = \frac{\rho_{h2} f_2 C_{h2}}{t'_{h2}} = \frac{f_2 Y_{h2}}{F} \tag{13C}$$

Substituting eqs. (9C), (9D), and (13C) in eq. (13B) gives eq. (13A).



EQ. (14): [PROBLEM XII-A]

$$P'_{h2} = 100A'_{h2} = 100 \frac{\theta_{h2}f_{h1}Y'_{bh} + f_2 \left\{ \frac{Y_{h2}}{\rho_{h2}} - \theta_{h2}Y'_{bh} \right\}}{F} \quad (14)$$

From eq. (14), we have

$$A'_{h2} = \frac{\theta_{h2}f_{h1}Y'_{bh}}{F} + \frac{f_2Y_{h2}}{\rho_{h2}F} - \frac{\theta_{h2}f_2Y'_{bh}}{F} \quad (14A)$$

Inserting the factor  $\theta_{h2}$  in eq. (9E) as coefficient of the terms concerned with the point of break in heating curve,

$$A'_{h2} = A''_{h2} + \theta_{h2}A'_{cbb} - \theta_{h2}A'_{cbh2} \quad (14B)$$

Substituting eqs. (9B), (9C), and (9D) into (14B), gives eq. (14A):

$$A'_{h2} = \frac{f_2Y_{h2}}{\rho_{h2}F} + \theta_{h2} \frac{f_{h1}Y'_{bh}}{F} - \theta_{h2} \frac{f_2Y'_{bh}}{F} \quad (14C)$$

EQ. (15): [PROBLEM XII-B]

$$P'_{ch2 < .1} = 100A'_{ch2 < .1} = 100 \left[ \frac{f_{h1}Y'_{bh} + f_2(Y_{h2 .1} - Y'_{bh})}{F} + \frac{B'_{h2 < .1}}{U} \right] \quad (15)$$

From eq. (15), we have

$$A'_{ch2 < .1} = \frac{f_{h1}Y'_{bh}}{F} + \frac{f_2Y_{h2 .1}}{F} - \frac{f_2Y'_{bh}}{F} + \frac{B'_{h2 < .1}}{U} \quad (15A)$$

From general eqs. (5G) and (5B)

$$A''_{ch2 .1} = \frac{f_2Y_{h2 .1}}{F} \quad (15B)$$

Substituting eqs. (9C), (15B), (9D), and (1C) in eq. (15A)

$$A'_{ch2 < .1} = A'_{cbb} + A''_{ch2 .1} - A'_{cbh2} + \frac{B'_{h2 < .1}}{t'_{.1}} \quad (15C)$$

We may make the following substitutions in eq. (5F):

$$A''_{ch2 < .1} \text{ for } A'_c < .1$$

$$A''_{ch2 .1} \text{ for } A'_c .1$$

$$\text{and } B'_{h2 < .1} \text{ for } B' < .1$$

giving

$$A''_{ch2 < .1} = A''_{ch2 .1} + \frac{B'_{h2 < .1}}{t'_{.1}} \quad (15D)$$

Substituting eq. (15D) in eq. (15C),

$$A'_{ch < .1} = A''_{ch2 < .1} + A'_{cbh} - A'_{cbh2} \tag{15E}$$

By definition, the only difference between the value of  $A'_{ch2 < .1}$  and that of  $A'_{h2 < .1}$  lies in the fact that the latter includes the cooling portion of the process while the former does not. Since, in the right-hand member of eq. (9H), the effect of the cooling portion is entirely included in the value of  $A''_{h2 < .1}$  it is evident that a change of the first term alone from  $A''_{h2 < .1}$  to  $A''_{ch2 < .1}$  will change the value of this member from that of  $A'_{h2 < .1}$  to that of  $A'_{ch2 < .1}$ . Thus, from eq. (9H),

$$A'_{ch2 < .1} = A''_{ch2 < .1} + A'_{cbh} - A'_{cbh2} \tag{15F}$$

which is identical to eq. (15E).

Eq. (16): [PROBLEM XII-B]

$$P'_{h2 < .1} = 100A'_{h2 < .1} = 100 \left[ \frac{\theta_{h2 < .1} f_{h1} Y'_{bh} + f_2 \left\{ \frac{Y_{h2 .1}}{\rho_{h2 .1}} - \theta_{h2 < .1} Y'_{bh} \right\}}{F} + \frac{B'_{h2 < .1}}{U} \right] \tag{16}$$

From eq. (16), we have

$$A'_{h2 < .1} = \frac{\theta_{h2 < .1} f_{h1} Y'_{bh}}{F} + \frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F \rho_{h2 .1}} - \frac{\theta_{h2 < .1} f_2 Y'_{bh}}{F} + \frac{B'_{h2 < .1}}{U} \tag{16A}$$

A rearrangement of terms shows eq. (16A) to be identical to eq. (9J).

Eq. (17): [PROBLEMS XIII-A, XIII-B, XIII-C, XIII-D, XIV-A, XIV-B, XV-A, XV-B, XVI-A, XVI-B]

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \tag{17}$$

The heating curve in a divided process is properly regarded as a curve having a break at the time retort temperature is changed. The value for slope,  $f_h$ , remains the same, however, since the origin of the curve before the break is  $RT_1$ , while the origin of the curve after the break is  $RT_2$ . Therefore, applying the principles discussed on pp. 64-67, Bull. 37, we derive from eq. (54),

$$A'_2 = \frac{f_h C_2}{t'_2} + f_h \left[ \frac{\rho'_{b1} C'_{b1}}{t'_{b1}} - \frac{\rho'_{b2} C'_{b2}}{t'_{b2}} \right] \tag{17A}$$

Imposing upon eq. (17A) the condition that the process is just sufficient for sterilization, we have

$$1 = \frac{f_h C_2}{t_2} + \frac{f_h \rho'_{b1} C'_{b1}}{t'_{b1}} - \frac{f_h \rho'_{b2} C'_{b2}}{t'_{b2}} \tag{17B}$$

From eq. (17B),

$$\frac{f_h C_2}{t_2} = 1 - \left[ \frac{f_h \rho'_{b1} C'_{b1}}{t'_{b1}} - \frac{f_h \rho'_{b2} C'_{b2}}{t'_{b2}} \right] \quad (17C)$$

By definition of symbol,  $V$ , and eq. (17C)

$$V = 1 - \left[ \frac{f_h \rho'_{b1} C'_{b1}}{t'_{b1}} - \frac{f_h \rho'_{b2} C'_{b2}}{t'_{b2}} \right] \quad (17D)$$

From general eqs. (3I) and (3H),

$$A'_{cb1} = \frac{\rho'_{b1} f_h C'_{b1}}{t'_{b1}} = \frac{f_h Y'_{b1}}{F} \quad (17E)$$

and

$$A'_{cb2} = \frac{\rho'_{b2} f_h C'_{b2}}{t'_{b2}} = \frac{f_h Y'_{b2}}{F} \quad (17F)$$

Substituting eqs. (17E) and (17F) into eq. (17D), we obtain eq. (17).

Eq. (18): [PROBLEMS XIII-A, XIII-C, XIV-A, XV-A, XVI-A]

$$x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} \quad (18)$$

Eq. (18) is obtained directly from eq. (1), p. 13, Bull. 37, by making the following substitutions of symbols:

$$\begin{aligned} x_c &\text{ for } x_h \\ g'_{b2} &\text{ for } y_h \\ g_2 &\text{ for } g \end{aligned}$$

Eq. (19): [PROBLEMS XIII-B, XIII-D, XIV-B, XV-B, XVI-B]

$$x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{.12} \left\{ Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}} \right\} \right] \quad (19)$$

From general eqs. (4B) and (3I),

$$A''_2 = \frac{f_h C_2}{t'_2} = \frac{f_h Y_2}{F \rho_2} \quad (19A)$$

Substituting eqs. (17E), (17F), and (19A) in (17A),

$$A'_2 = A''_2 + A'_{cb1} - A'_{cb2} \quad (19B)$$

For the condition,  $g'_2 = 0.1^\circ$ , we have, from eq. (19A),

$$A''_{2.1} = \frac{f_h C_{2.1}}{t'_{2.1}} = \frac{f_h Y_{2.1}}{F \rho_{2.1}} \quad (19C)$$

and, when  $g'_2 < 0.1^\circ$ , we have, from eq. (5E),

$$A''_{2 < .1} = A''_{2 .1} + \frac{B'_{2 < .1}}{t'_{2 .1}} \quad (19D)$$

Applying condition  $g_2 < 0.1^\circ$  to eq. (19B), we obtain

$$A'_{2 < .1} = A''_{2 < .1} + A'_{cb1} - A'_{cb2} \quad (19E)$$

Substituting eq. (19D) into eq. (19E),

$$A'_{2 < .1} = A''_{2 .1} + A'_{cb1} - A'_{cb2} + \frac{B'_{2 < .1}}{t'_{2 .1}} \quad (19F)$$

If we impose the condition that the process is just sufficient for sterilization, eq. (19F) becomes

$$1 = A''_{2 .1} + A'_{cb1} - A'_{cb2} + \frac{h_b}{t'_{2 .1}} \quad (19G)$$

Solving eq. (19G) for  $h_b$ ,

$$h_b = t'_{2 .1} (1 - A''_{2 .1} - A'_{cb1} + A'_{cb2}) \quad (19H)$$

We may make the following substitutions in eq. (1), p. 13, Bull. 37:

$$B'_{b2} \text{ for } x_h$$

$$g'_{b2} \text{ for } y_h$$

$$\text{and } 0.1 \text{ for } g$$

giving

$$\frac{B'_{b2}}{f_h} = \log \frac{g'_{b2}}{0.1} \quad (19I)$$

from which

$$B'_{b2} = f_h (1 + \log g'_{b2}) \quad (19J)$$

By definition,

$$x_c < .1 = B'_{b2} + h_b \quad (19K)$$

Substituting eqs. (19C), (17E), (19B), and (1C) into eq. (19H), then eqs. (19J) and (19H) into eq. (19K), we have

$$x_c < .1 = f_h (1 + \log g'_{b2}) + U_2 \left[ 1 - \frac{f_h Y_{2 .1}}{F \rho_{2 .1}} - \frac{f_h Y'_{b1}}{F} + \frac{f_h Y'_{b2}}{F} \right] \quad (19L)$$

By definition

$$F_{i2} = \frac{U_2}{F} \quad (19M)$$

Rearranging eq. (19L) and substituting eq. (19M) into eq. (19L) gives eq. (19).



Eq. (20): [PROBLEMS XV-A, XV-B, XVI-A, XVI-B]

$$g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} \right] \quad (20)$$

Imposing on eq. (18) the condition that the process is a given process, we have

$$x_{ca} = f_{ha} \log \frac{g'_{b2a}}{g_{2a}} \quad (20A)$$

Rearrangement of eq. (20A) gives eq. (20).

Eq. (21): [PROBLEMS XV-A, XVI-A]

$$F = f_{ha} \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} \right] \quad (21)$$

From eqs. (19A), (19B), (17E), and (17F), we have

$$A'_{2a} = \frac{f_h Y_{2a}}{F \rho_{2a}} + \frac{f_h Y'_{b1a}}{F} - \frac{f_h Y'_{b2a}}{F} \quad (21A)$$

If we impose the condition that the process is just sufficient for sterilization, eq. (21A) becomes

$$1 = \frac{f_h Y_{2a}}{F \rho_{2a}} + \frac{f_h Y'_{b1a}}{F} - \frac{f_h Y'_{b2a}}{F} \quad (21B)$$

Converting eq. (21B) to apply to a known process:

$$1 = \frac{f_{ha} Y'_{b1a}}{F} - \frac{f_{ha} Y'_{b2a}}{F} + \frac{f_{ha} Y_{2a}}{F \rho_{2a}} \quad (21C)$$

Solving eq. (21C) for F, we obtain eq. (21).

Eq. (22): [PROBLEMS XV-B, XVI-B]

$$F = f_{ha} \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} - \frac{\log g_{2a} < .1 + 1}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z}} \right] \quad (22)$$

By substitutions in eq. (1), p. 13, Bull. 37, we have

$$\frac{h_b}{f_h} = \log \frac{0.1}{g_{2a} < .1} \quad (22A)$$

Solving for  $h_b$ ,

$$h_b = f_h (-1 - \log g_{2a} < .1) \quad (22B)$$

By other substitutions in eq. (1), p. 13, Bull. 37, we have

$$\frac{250^\circ - RT_2}{z} = \log \frac{t'_{2.1}}{F} \quad (22C)$$

Solving for  $t'_{2.1}$ ,

$$t'_{2.1} = F \log^{-1} \frac{250^\circ - RT_2}{z} \quad (22D)$$

Substituting eqs. (19C), (17E), (17F), (22B), and (22D) into eq. (19G), we have

$$1 = \frac{f_h Y_{2.1}}{F \rho_{2.1}} + \frac{f_h Y'_{b1}}{F} - \frac{f_h Y'_{b2}}{F} - \frac{f_h (1 + \log g_{2.1})}{F \log^{-1} \frac{250^\circ - RT_2}{z}} \quad (22E)$$

Converting eq. (22E) to apply to a known process:

$$1 = \frac{f_{ha} Y_{2.1a}}{F \rho_{2.1a}} + \frac{f_{ha} Y'_{b1a}}{F} - \frac{f_{ha} Y'_{b2a}}{F} - \frac{f_{ha} (1 + \log g_{2.1a})}{F \log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z}} \quad (22F)$$

Solving eq. (22F) for  $F$ , we obtain eq. (22).

Eq. (23): [PROBLEM XIX-A]

$$P'_{c2} = 100A'_{c2} = 100 \frac{f_h}{F} (Y'_{b1} - Y'_{b2} + Y_2) \quad (23)$$

From eq. (23), we have

$$A'_{c2} = \frac{f_h Y'_{b1}}{F} - \frac{f_h Y'_{b2}}{F} + \frac{f_h Y_2}{F} \quad (23A)$$

From general eqs. (3I) and (3J),

$$A''_{c2} = \frac{f_h Y_2}{F} \quad (23B)$$

From eqs. (23A), (23B), (17E), and (17F), we have

$$A'_{c2} = A''_{c2} - A'_{cb2} + A'_{cb1} \quad (23C)$$

By definition, the only difference between the value of  $A'_{c2}$  and that of  $A'_2$  lies in the fact that the latter includes the cooling portion of the process while the former does not. Since, in the right-hand member of eq. (19B), the effect of the cooling portion is entirely included in the value of  $A''_2$ , it is evident that a change of the first term alone from  $A''_2$  to  $A''_{c2}$  will change the value of this member from that of  $A'_2$  to that of  $A'_{c2}$ . Thus, from eq. (19B)

$$A'_{c2} = A''_{c2} + A'_{cb1} - A'_{cb2} \quad (23D)$$

which is identical to eq. (23C).

EQ. (24): [PROBLEM XIX-A]

$$P'_2 = 100A'_2 = 100 \frac{f_h}{F} \left( Y'_{b1} - Y'_{b2} + \frac{Y_2}{\rho_2} \right) \quad (24)$$

From eq. (24), we have

$$A'_2 = \frac{f_h Y'_{b1}}{F} - \frac{f_h Y'_{b2}}{F} + \frac{f_h Y_2}{F \rho_2} \quad (24A)$$

Substituting eqs. (19A), (17E), and (17F) into eq. (19B), we obtain eq. (24A).

EQ. (25): [PROBLEM XIX-B]

$$P'_{c2 < .1} = 100A'_{c2 < .1} = 100 \frac{f_h}{F} (Y'_{b1} - Y'_{b2} + Y_{2 .1}) + \frac{B'_{2 < .1}}{U_2} \quad (25)$$

From eq. (25), we have

$$A'_{c2 < .1} = \frac{f_h Y'_{b1}}{F} - \frac{f_h Y'_{b2}}{F} + \frac{f_h Y_{2 .1}}{F} + \frac{B'_{2 < .1}}{U_2} \quad (25A)$$

From general eqs. (5G) and (5B),

$$A''_{c2 .1} = \frac{f_h Y_{2 .1}}{F} \quad (25B)$$

Substituting eqs. (17E), (17F), (25B), and (1C) in eq. (25A),

$$A'_{c2 < .1} = A'_{cb1} - A'_{cb2} + A''_{c2 .1} + \frac{B'_{2 < .1}}{t'_{2 .1}} \quad (25C)$$

By definition, the only difference between the value of  $A'_{c2 < .1}$  and that of  $A'_{2 < .1}$  lies in the fact that the latter includes the cooling portion of the process while the former does not. Since, in the right-hand member of eq. (19F), the effect of the cooling portion is entirely included in the value of  $A''_{2 .1}$ , it is evident that a change of the first term alone from  $A''_{2 .1}$  to  $A''_{c2 .1}$  will change the value of this member from that of  $A'_{2 < .1}$  to that of  $A'_{c2 < .1}$ . Thus, from eq. (19F),

$$A'_{c2 < .1} = A''_{c2 .1} + A'_{cb1} - A'_{cb2} + \frac{B'_{2 < .1}}{t'_{2 .1}} \quad (25D)$$

which is identical to eq. (25C).

EQ. (26): [PROBLEM XIX-B]

$$P'_{2 < .1} = 100A'_{2 < .1} = 100 \frac{f_h}{F} \left[ Y'_{b1} - Y'_{b2} + \frac{Y_{2 .1}}{\rho_{2 .1}} \right] + \frac{B'_{2 < .1}}{U_2} \quad (26)$$

From eq. (26), we have

$$A'_{2 < .1} = \frac{f_h Y'_{b1}}{F} - \frac{f_h Y'_{b2}}{F} + \frac{f_h Y_{2 .1}}{F \rho_{2 .1}} + \frac{B'_{2 < .1}}{U_2} \quad (26A)$$

Substituting eqs. (19C), (17E), (17F), and (1C) into eq. (19F), we obtain eq. (26A).

## I

SYMBOLS USED IN CLASS 1, GROUP 1, PROBLEMS I-A TO VI-B  
INCLUSIVE. SIMPLE PROCESS; SIMPLE LOGARITHMIC  
HEATING CURVE

---

THE SYMBOLS AND DEFINITIONS GIVEN BELOW REFER TO THE PROCESS THAT IS BEING CALCULATED. ALL SYMBOLS USED IN THE PROBLEMS TO WHICH IS APPENDED THE SUBSCRIPT,  $a$ , ARE DEFINED AS GIVEN BELOW FOR THE SAME SYMBOLS WITHOUT THIS SUBSCRIPT; BUT THEY REFER, NOT TO THE PROCESS BEING CALCULATED, BUT TO A GIVEN PROCESS, AN EQUIVALENT OF WHICH IS BEING CALCULATED.

---

$A'$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$A'_{.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.

$A'_{<.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{<.1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$A_c$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $A_c = \rho$ .

$A'_c$  — $[= \rho' A']$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$A_{c.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans. By definition,  $A_{c.1} = \rho_{.1}$ .



- $A'_{c.1}$  — $[=\rho_{.1}A'_{.1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $A_{c < .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $A_{c < .1} = \rho_{.1}$ .
- $A'_{c < .1}$  — $[=\rho_{.1}A'_{< .1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g' < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $a$  —Subscript used with symbols when they refer to a given process, an equivalent of which is being calculated.
- $B_B$  — $[=f_h B_{kB}]$ —Length of process in minutes. By definition,  $B_B = x$ .
- $B$  — $[=f_h B_k]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $B'$  — $[=f_h B'_k]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $B_{< .1}$  — $[=f_h B_{k < .1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) to  $g < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $B'_{< .1}$  — $[=f_h B'_{k < .1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) to  $g' < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $B''$  — $[=f_h B''_k]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $B''_o$  — $[=f_h B''_{ko}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1 j$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $B_{kB}$  —Length of the process if the value of  $f_h$  were 1.
- $B_k$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_h = 1$ .
- $B'_k$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_h = 1$ .
- $B_{k < .1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) to  $g < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_h = 1$ .

- $B'_{k < .1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) to  $g'_{< .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_h = 1$ .
- $B''_k$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_h = 1$ .
- $B''_{k0}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1 j$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_h = 1$ .
- $C$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions  $f_h = 1$  and  $t = 1$ .
- $C'$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions  $f_h = 1$  and  $t' = 1$ .
- $C_{.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions  $f_h = 1$  and  $t_{.1} = 1$ ; when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $C'_{.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions  $f_h = 1$  and  $t' = 1$ ; when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $C_{< .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g_{< .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions  $f_h = 1$  and  $t_{< .1} = 1$ .
- $C'_{< .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{< .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions  $f_h = 1$  and  $t'_{< .1} = 1$ .
- $CT_M$  —Maximum temperature attained at center of can when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $CT'$  —Temperature at center of can at any chosen instant when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant the center of the can reached temperature  $CT'$ , would be either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.

- CW* —Temperature of cooling water.
- F* —Number of minutes required to destroy organism at 250°.
- F<sub>i</sub>* — $\left[ = \frac{U}{F} \right]$ —Number of minutes required to destroy organism at retort temperature (*RT*) when *F* = 1.
- F<sub>o</sub>* —The "order" of a process; representing the number of minutes required to destroy organism at 250° when *z* (of the real or the assumed thermal death time curve) equals 18°. *F<sub>o</sub>* serves as a standard by means of which the sterilizing values of different processes may be compared. A "process of order, 10," for instance, is a process which, theoretically, gives 100 per cent sterilization when calculated on the basis of a thermal death time curve passing through the point, 10 minutes, 250°, and having a slope, *z*, of 18°.
- f<sub>h</sub>* —Represents slope of heating curve.
- g* —Difference in degrees between retort temperature (*RT*) and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process when the difference between this temperature and retort temperature (*RT*) is not less than 0.1°.
- g'* —Difference in degrees between retort temperature (*RT*) and temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant when the difference between this temperature and retort temperature (*RT*) is not less than 0.1° and when the process (heating and cooling portions combined), with steam turned off and water cooling begun at the given instant, is either greater than or less than sufficient to sterilize the food in the cans.
- g* < .1 —Difference in degrees between retort temperature (*RT*) and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process when the difference between this temperature and retort temperature (*RT*) is less than 0.1°.
- g'* < .1 —Difference in degrees between retort temperature (*RT*) and temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant when the difference between this temperature and retort temperature (*RT*) is less than 0.1° and when the process (heating and cooling portions combined), with steam turned off and water cooling begun at the given instant is either greater than or less than sufficient to sterilize the food in the cans.
- g<sub>F</sub>* —Difference in degrees between 250° and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process.
- g'<sub>F</sub>* —Difference in degrees between 250° and the temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant during the process.



- $h$  —The number of minutes required to complete a process after the temperature at center of can reaches  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ). By definition  $h = B_{<.1}$ .
- $IT$  —Initial temperature of can.
- $I$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and initial temperature ( $IT$ ).
- $j$  —An arbitrary factor, which, when multiplied by  $I$ , designates the point of intersection of the vertical line representing the beginning of a process with the extension of the straight portion of the semi-log heating curve, when no time is consumed in bringing the retort to processing temperature.  $j$  has a similar application with reference to the cooling curve when it is multiplied by the quantity,  $m$ . See paragraphs 5 and 6 of Introduction.
- $m$  —Difference in degrees between cooling water temperature ( $CW$ ) and the maximum temperature attained at center of can.
- $m+g$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and cooling water temperature ( $CW$ ).
- $P'$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $P'_{.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $P'_{<.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{<.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $P_c$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $P_c = 100\rho$ .
- $P'_c$  — $[=\rho'P']$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $P_{c.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans. By definition,  $P_{c.1} = 100\rho_{.1}$ .



- $P'_{c.1}$  — $[= \rho_{.1} P'_{.1}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $P_{c < .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{< .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $P_{c < .1} = 100\rho_{< .1}$ .
- $P'_{c < .1}$  — $[= \rho_{.1} P'_{< .1}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{< .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $RT$  —Retort temperature.
- $\rho$  —The fraction of the total lethal value of a process which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition  $\rho = A_c$ .
- $\rho'$  —The fraction of the total lethal value of a process which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $\rho_{.1}$  —The fraction of the total lethal value of a process which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $0.1$ ,  $g_{< .1}$ , or  $g'_{< .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $T$  —Arbitrary constant—table I-B—used in calculating a process. By definition,  $T = C_{.1}$  or  $T = C'_{.1}$ .
- $t$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t'$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t_{.1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans if the maximum temperature attained at center of can is  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $t'_{.1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans if the maximum temperature attained at center of can is  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $U$  —Number of minutes necessary to destroy organism at retort temperature ( $RT$ ).

- $x$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $x = B_B$ .
- $x'$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $Y$  — $[=ZY'_{220}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions,  $f_h = 1$  and  $F = 1$ .  $RT$  has any given value.
- $Y'$  — $[=Z'Y'_{220}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions,  $f_h = 1$  and  $F = 1$ .  $RT$  has any given value.
- $Y_{.1}$  — $[Z_{.1}Y_{220 .1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions  $f_h = 1$  and  $F = 1$ ; when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.  $RT$  has any given value.
- $Y'_{.1}$  — $[=Z'_{.1}Y'_{220 .1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions,  $f_h = 1$  and  $F = 1$ ; when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.  $RT$  has any given value.
- $Y_{<.1}$  — $[=Z_{<.1}Y_{220 <.1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{<.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions,  $f_h = 1$  and  $F = 1$ .  $RT$  has any given value.
- $Y'_{<.1}$  — $[=Z'_{<.1}Y'_{220 <.1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{<.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ) assuming conditions,  $f_h = 1$  and  $F = 1$ .  $RT$  has any given value.
- $Y_{220}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $f_h = 1$ ,  $F = 1$ , and  $RT = 220^\circ$ .
- $Y'_{220}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $f_h = 1$ ,  $F = 1$ , and  $RT = 220^\circ$ .

- $Y_{220 .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $f_h = 1$ ,  $F = 1$ , and  $RT = 220^\circ$ ; when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $Y'_{220 .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions  $f_h = 1$ ,  $F = 1$ , and  $RT = 220^\circ$ ; when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $Y_{220 <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{<.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $f_h = 1$ ,  $F = 1$ , and  $RT = 220^\circ$ .
- $Y'_{220 <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{<.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $f_h = 1$ ,  $F = 1$ , and  $RT = 220^\circ$ .
- $y_h$  —The temperature coordinate of the heating curve, representing the number of degrees to retort temperature.
- $Z$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220}$  to a value ( $Y$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z$  is the number whose logarithm is  $(RT - 220^\circ) \div z$ .
- $Z'$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y'_{220}$  to a value ( $Y'$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z'$  is the number whose logarithm is  $(RT - 220^\circ) \div z$ .
- $Z_{.1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220 .1}$  to a value ( $Y_{.1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{.1}$  is the number whose logarithm is  $(RT - 220^\circ) \div z$ .
- $Z'_{.1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y'_{220 .1}$  to a value ( $Y'_{.1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z'_{.1}$  is the number whose logarithm is  $(RT - 220^\circ) \div z$ .
- $Z_{<.1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220 <.1}$  to a value ( $Y_{<.1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{<.1}$  is the number whose logarithm is  $(RT - 220^\circ) \div z$ .
- $Z'_{<.1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y'_{220 <.1}$  to a value ( $Y'_{<.1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z'_{<.1}$  is the number whose logarithm is  $(RT - 220^\circ) \div z$ .
- $z$  —Represents slope of thermal death time curve.

## PROBLEM I-A

Simple process. Calculation of length of process when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2. ( $RT - CT_M$ ) is greater than  $0.1^\circ$  (see note A).

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  
250°.....( $F = 15$  minutes)
- (5) Retort temperature.....( $RT = 244^\circ$ )
- (6) Initial temperature.....( $IT = 185^\circ$ )
- (7) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .

Find process,  $B_B$ , necessary for sterilization.

Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1 gives  $f_h = 62$  minutes for No. 2 cans.
3. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 244^\circ$  on scale A,  $F_i = 2.18$  minutes.
4.  $U = FF_i = 15 \times 2.18 = 32.8$  minutes.
5.  $\frac{f_h}{U} = \frac{62}{32.8} = 1.89$ .

NOTE A: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f_h}{U}$  below about 0.577 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $\frac{f_h}{U}$  (step 5) were found less than 0.577, the problem would be solved from this point by method of problem I-B, steps 6—14.

6.  $m + g = RT - CW = 244^\circ - 70^\circ = 174^\circ$ .
7. On chart 3, on curve for  $m + g = 130^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $\frac{f_h}{U} = 1.89$ ,  
 $g_{130} = 1.92^\circ$ ; on curve for  $m + g = 180^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $\frac{f_h}{U} = 1.89$ ,  
 $g_{180} = 1.80^\circ$ . Interpolating; find, for  $m + g = 174^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ,  $g = 1.82^\circ$ .
8.  $I = RT - IT = 244^\circ - 185^\circ = 59^\circ$ .
9.  $jI = 1.41 \times 59^\circ = 83.19^\circ$ .
10. On chart 4; find, for  $jI = 83.19^\circ$ ,  $B''_k = 2.915$  minutes; and for  $g = 1.82^\circ$ ,  
 $B_k = 1.26$  minutes.
11.  $B_{kB} = B''_k - B_k = 2.915 - 1.260 = 1.655$  minutes.
12.  $B_B = f_h B_{kB} = 62 \times 1.655 = 102.5$  minutes = length of process. (See curves I-A, chart 7, sections A and A'.



## PROBLEM I-B

Simple process. Calculation of length of process when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2.  $(RT - CT_M)$  is less than  $0.1^\circ$  (see note A).

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve .....( $z = 18.5^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  
250°.....( $F = 15$  minutes)
- (5) Retort temperature.....( $RT = 244^\circ$ )
- (6) Initial temperature.....( $IT = 140^\circ$ )
- (7) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .

Find process,  $B_B$ , necessary for sterilization.

Solution:

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1 gives  $f_h = 13$  minutes for No. 10 can.
3. On chart 2, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$ ; find, for  $RT = 244^\circ$  on scale A,  
 $F_i = 2.10$  minutes.
4.  $U = FF_i = 15 \times 2.10 = 31.5$  minutes.
5.  $\frac{f_h}{U} = \frac{13}{31.5} = 0.412$ .

NOTE A: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18.5^\circ$ , all values of  $\frac{f_h}{U}$  below about  $0.570$  give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . Thus, here, the value of  $g < 0.1$  cannot be taken from the curves of chart 3. If  $\frac{f_h}{U}$  (step 5) were found greater than  $0.570$ , the problem would be solved from this point by method of problem I-A, steps 6—12.

6. Use equation (1):

$$B_B = B'' + U - f_h T \quad (1)$$

7.  $m + g = RT - CW = 244^\circ - 70^\circ = 174^\circ$ .
8. From table 1-B (below), interpolating for  $z = 18.5^\circ$ ; find  $T = 1.771$  when  $m + g = 170^\circ$ , and  $T = 1.769$  when  $m + g = 175^\circ$ . Therefore,  $T = 1.769$  when  $m + g = 174^\circ$ .
9.  $f_h T = 13 \times 1.769 = 22.997$ .
10.  $I = RT - IT = 244^\circ - 140^\circ = 104^\circ$ .
11.  $jI = 1.41 \times 104^\circ = 146.64^\circ$ .
12. On chart 4; find, for  $jI = 146.64^\circ$ ,  $B''_k = 3.160$  minutes.
13.  $B'' = f_h B''_k = 13 \times 3.160 = 41.0$  minutes.
14. From step 13,  $B'' = 41.0$  minutes; from step 4,  $U = 31.5$  minutes; and from step 9,  $f_h T = 23.0$  minutes. By equation (1),  $B_B = 41.0 + 31.5 - 23.0 = 49.5$  minutes = length of process. (See curves I-B, chart 7, sections B and B').

TABLE 1-B

$z \rightarrow$	6	8	10	12	14	16
$m+g$	$T$	$T$	$T$	$T$	$T$	$T$
130	1.275	1.400	1.500	1.585	1.659	1.716
135	1.274	1.399	1.498	1.583	1.658	1.714
140	1.272	1.398	1.497	1.582	1.657	1.713
145	1.271	1.397	1.495	1.580	1.655	1.712
150	1.270	1.395	1.494	1.579	1.654	1.710
155	1.268	1.394	1.492	1.578	1.652	1.709
160	1.267	1.392	1.491	1.576	1.651	1.707
165	1.265	1.391	1.489	1.574	1.649	1.705
170	1.264	1.388	1.488	1.572	1.648	1.702
175	1.262	1.388	1.487	1.570	1.646	1.700
180	1.261	1.386	1.485	1.569	1.644	1.698
185	1.260	1.384	1.484	1.568	1.642	1.696
190	1.258	1.383	1.482	1.566	1.641	1.695

$z \rightarrow$	18	20	22	24	26
$m+g$	$T$	$T$	$T$	$T$	$T$
130	1.772	1.823	1.870	1.914	1.950
135	1.771	1.822	1.868	1.912	1.948
140	1.769	1.820	1.867	1.910	1.946
145	1.768	1.818	1.865	1.908	1.944
150	1.766	1.816	1.863	1.906	1.942
155	1.764	1.814	1.861	1.904	1.940
160	1.762	1.812	1.859	1.902	1.938
165	1.760	1.810	1.857	1.900	1.936
170	1.758	1.808	1.855	1.898	1.933
175	1.756	1.806	1.853	1.896	1.931
180	1.754	1.804	1.851	1.894	1.928
185	1.752	1.802	1.859	1.892	1.926
190	1.750	1.800	1.848	1.890	1.925

## PROBLEM II-A

Simple process. Calculation of a process equivalent to a given process at a different retort temperature when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2.  $(RT - CT_M)$  is greater than  $0.1^\circ$  (see notes C and E).

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Retort temperature.....( $RT = 250^\circ$ )
- (5) Initial temperature.....( $IT = 185^\circ$ )
- (6) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (7)  $j = 1.41$ .
- (8) Necessary process at another re-  
tort temperature.....( $B_{Ba} = 102.5$  minutes when  $RT_a = 244^\circ$ )

Find process,  $B_B$ , necessary for sterilization when processing temperature is  $250^\circ$ .

NOTE A: If a value of  $z$  is not specified, one may be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

Solution:

NOTE B: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—14).

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1 gives  $f_{ha} = 62$  minutes for No. 2 cans.
3.  $I_a = RT_a - IT = 244^\circ - 185^\circ = 59^\circ$ .
4.  $jI_a = 1.41 \times 59^\circ = 83.19^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $jI_a = 83.19^\circ$ ,  $B''_{ka} = 2.915$  minutes.
6.  $B''_a = f_{ha} B''_{ka} = 62 \times 2.915 = 180.5$  minutes.

NOTE C: If  $B''_a$  were less than  $B_{Ba}$  [item (8) under Specifications], it would show that  $RT_a - CT_{Ma}$  is less than  $0.1^\circ$ . If such were the case, the problem would be solved from this point by method of problem II-B, steps 8—24.

7.  $B_a = B''_a - B_{Ba} = 180.5 - 102.5 = 78$  minutes.
8.  $B_{ka} = \frac{B_a}{f_{ha}} = \frac{78}{62} = 1.26$  minutes.
9. On chart 4; find, for  $B_{ka} = 1.26$  minutes,  $g_a = 1.82^\circ$ .
10.  $(m + g)_a = RT_a - CW = 244^\circ - 70^\circ = 174^\circ$ .

11. On chart 3; on curve for  $m+g=130^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $g_a=1.82^\circ$ ,  $\left(\frac{f_{ha}}{U_a}\right)_{130}=1.80$ ; on curve for  $m+g=180^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $g_a=1.82^\circ$ ,  $\left(\frac{f_{ha}}{U_a}\right)_{180}=1.90$ . Interpolating, find, for  $(m+g)_a=174^\circ$  and  $z=18^\circ$ ,  $\frac{f_{ha}}{U_a}=1.88$ .

12.  $U_a = \frac{f_{ha}}{1.88} = \frac{62}{1.88} = 32.98$  minutes.

13. On chart 2, on curve,  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT=244^\circ$  on scale A,  $F_{ia}=2.18$  minutes; and, for  $RT=250^\circ$  on scale A,  $F_i=1.00$  minute.

14.  $F = \frac{U_a}{F_{ia}} = \frac{32.98}{2.18} = 15.1$  minutes.

NOTE D: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (102.5 minutes at  $244^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time which will be necessary with  $RT=250^\circ$  to give an equivalent process. This part of the problem is analogous to problem I-A.

15.  $U = FF_i = 15.1 \times 1.00 = 15.1$  minutes.

16.  $\frac{f_h}{U} = \frac{62}{15.1} = 4.11$ .

NOTE E: On chart 3, it is seen that, when  $z=18^\circ$ , all values of  $\frac{f_h}{U}$  below about 0.577 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $\frac{f_h}{U}$  (step 16) were found less than 0.577, the problem would be solved from this point by method of problem II-B, steps 16—24. The solution which follows in steps 17—23 is that of problem I-A, steps 6—12.

NOTE F: In case it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for a different retort temperature, the value of  $f_h$  will be different from that of  $f_{ha}$ . In this problem,  $f_h = f_{ha}$ .

NOTE G: If the process to be calculated were a two-temperature, or divided, process, the completion of the solution from this point would be according to the method either of problem XIII-A or of problem XIII-C. The choice between the two methods would depend upon whether, in the Specifications of the problem, the value of  $x'_b$  or the value of  $CT'_b$  were given.

17.  $m+g=RT-CW=250^\circ-70^\circ=180^\circ$ .

18. On chart 3, on curve for  $m+g=180^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f_h}{U}=4.11$ ,  $g=4.63^\circ$ .

19.  $I=RT-IT=250^\circ-185^\circ=65^\circ$ .

20.  $jI=1.41 \times 65^\circ=91.65^\circ$ .

21. On chart 4; find, for  $jI=91.65^\circ$ ,  $B''_k=2.96$  minutes; and for  $g=4.63^\circ$ ,  $B_k=1.66$  minutes.

22.  $B_{kB}=B''_k-B_k=2.96-1.66=1.30$  minutes.

23.  $B_B=f_h B_{kB}=62 \times 1.30=80.6$  minutes=length of process. (See curves II-A, chart 7, sections A and A'.



## PROBLEM II-B

Simple process. Calculation of a process equivalent to a given process at a different retort temperature when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2.  $(RT - CT_M)$  is less than  $0.1^\circ$  (see notes B and D).

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 240^\circ$ )
- (4) Initial temperature.....( $IT = 140^\circ$ )
- (5) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (6)  $j = 1.41$ .
- (7) Necessary process at another retort temperature.....( $B_{Ba} = 49.5$  minutes when  $RT_a = 244^\circ$ )

Find process,  $B_B$ , necessary for sterilization when processing temperature is  $240^\circ$ .

Solution:

NOTE A: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—14).

1. Assume a slope of thermal death time curve:  $z = 18^\circ$ . (See paragraph 8 of Introduction).
2. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
3. Interpolating for curve 1.3 on chart 1 gives  $f_{ha} = 13$  for No. 10 cans.
4.  $I_a = RT_a - IT = 244^\circ - 140^\circ = 104^\circ$ .
5.  $jI_a = 1.41 \times 104^\circ = 146.64^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI_a = 146.64^\circ$ ,  $B''_{ka} = 3.160$  minutes.
7.  $B''_a = f_{ha}B''_{ka} = 13 \times 3.160 = 41.0$  minutes.

NOTE B: Since  $B''_a$  is less than  $B_{Ba}$  [item (7) under Specifications],  $RT_a - CT_{Ma}$  is less than  $0.1^\circ$ . If  $B''_a$  were greater than  $B_{Ba}$ , the problem would be solved from this point by method of problem II-A, steps 7—23.

8. Use equation (2):

$$U_a = B_{Ba} - B''_a + f_{ha}T_a \quad (2)$$

9.  $(m+g)_a = RT_a - CW = 244^\circ - 70^\circ = 174^\circ$ .
10. From table 1-B, interpolating for  $(m+g)_a = 174^\circ$ ; find  $T_a = 1.756$ .
11.  $f_{ha}T_a = 13 \times 1.756 = 22.828$ .
12. From item (7) under Specifications,  $B_{Ba} = 49.5$  minutes; from step 7,  $B''_a = 41.0$  minutes; and from step 11,  $f_{ha}T_a = 22.828$  minutes. By equation (2),

$$U_a = 49.5 - 41.0 + 22.8 = 31.3 \text{ minutes.}$$

13. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_a = 244^\circ$  on scale A,  $F_{ia} = 2.18$  minutes; and, for  $RT = 240^\circ$  on scale A,  $F_i = 3.61$  minutes.

$$14. F = \frac{U_a}{F_{ia}} = \frac{31.30}{2.18} = 14.4 \text{ minutes.}$$

NOTE C: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (49.5 minutes at  $244^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time which will be necessary with  $RT=240^\circ$  to give an equivalent process. This part of the problem is analogous to problem I-B.

NOTE D: Since the new retort temperature ( $RT$ ) is lower than the old ( $RT_a$ ), it is certain that  $RT-CT_M$  will again be less than  $0.1^\circ$ . If  $RT$  were higher than  $RT_a$ , it might happen that  $RT-CT_M$  in our new case would be greater than  $0.1^\circ$ . If this were true, the problem would be solved from this point by method of problem I-A, steps 4—12. Since we know that  $RT-CT_M < 0.1^\circ$ , step 5 under problem I-B may be omitted.

$$15. U = FF_i = 14.4 \times 3.61 = 52 \text{ minutes.}$$

NOTE E: If the process to be calculated were a two-temperature, or divided, process, the completion of the solution from this point would be according to the method either of problem XIII-B or of problem XIII-D. The choice between the two methods would depend upon whether, in the Specifications of the problem, the value of  $x'_b$  or the value of  $CT'_b$  were given.

16. Use equation (1):

$$B = B'' + U - f_h T \quad (1)$$

$$17. m + g = RT - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ.$$

$$18. \text{ From table 1-B, when } z = 18^\circ \text{ and } m + g = 170^\circ, T = 1.758.$$

$$19. f_h T = 13 \times 1.758 = 22.854.$$

NOTE F: In case it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for a different retort temperature, the value of  $f_h$  will be different from that of  $f_{ha}$ . In this problem,  $f_h = f_{ha}$ .

$$20. I = RT - IT = 240^\circ - 140^\circ = 100^\circ.$$

$$21. jI = 1.41 \times 100^\circ = 141^\circ.$$

$$22. \text{ On chart 4; find, for } jI = 141^\circ, B''_k = 3.15 \text{ minutes.}$$

$$23. B'' = f_h B''_k = 13 \times 3.15 = 41 \text{ minutes.}$$

$$24. \text{ From step 23, } B'' = 41.0 \text{ minutes; from step 15, } U = 52.0 \text{ minutes; and from step 19, } f_h T = 22.9 \text{ minutes. By equation (1),} \\ B_B = 41.0 + 52.0 - 22.9 = 70.1 \text{ minutes = length of process. (See curves II-B, chart 7, sections B and B').}$$

### PROBLEM III

Simple process. Calculation of effect of change in initial temperature upon the time necessary for sterilization when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2. ( $RT-CT_M$ ) has any value.

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 250^\circ$ )
- (4) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (5) Necessary process at another initial temperature.....( $B_{Ba} = 80$  minutes when  $IT_a = 185^\circ$ )

Find process,  $B_B$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $160^\circ$ .

Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1 gives  $f_h = 62$  minutes for No. 2 cans.
3.  $I = RT - IT = 250^\circ - 160^\circ = 90^\circ$ .
4.  $I_a = RT - IT_a = 250^\circ - 185^\circ = 65^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $I = 90^\circ$ ,  $B''_{ko} = 2.95$  minutes; and for  $I_a = 65^\circ$ ,  $B''_{koa} = 2.815$  minutes.
6.  $B''_{ko} - B''_{koa} = 2.95 - 2.815 = 0.135$  minute.
7.  $f_h(B''_{ko} - B''_{koa}) = 62 \times 0.135 = 8.4$  minutes, which must be added to the process.
8.  $B_B = B_a + f_h(B''_{ko} - B''_{koa}) = 80.0 + 8.4 = 88.4$  minutes = length of process. (See curves III, chart 7, sections A and A').

#### PROBLEM IV

Simple process. Calculation of time necessary to reach a given temperature at center of can when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2.  $(RT - CT')$  has any value.

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 250^\circ$ )
- (4) Initial temperature.....( $IT = 190^\circ$ )
- (5)  $j = 1.41$ .

Find time,  $x'$ , necessary to reach  $235^\circ$  ( $CT'$ ) at center of can.

Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1 gives  $f_h = 195$  minutes for No. 10 cans.
3.  $I = RT - IT = 250^\circ - 190^\circ = 60^\circ$ .
4.  $jI = 1.41 \times 60^\circ = 84.6^\circ$ .
5.  $g' = RT - CT' = 250^\circ - 235^\circ = 15^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI = 84.6^\circ$ ,  $B''_k = 2.927$  minutes; and for  $g' = 15^\circ$ ,  $B'_k = 2.179$  minutes.
7.  $\frac{x'}{f_h} = B''_k - B'_k = 2.927 - 2.179 = 0.748$  minute.
8.  $x' = f_h \frac{x'}{f_h} = 195 \times 0.748 = 146.0$  minutes—time necessary to reach  $235^\circ$ . (See curves IV, chart 7, sections A and A').

#### PROBLEM V

Simple process. Calculation of temperature attained at center of can in a given length of time when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2.  $(RT - CT')$  has any value.

## Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 10)....
- (3) Retort temperature.....( $RT = 250^\circ$ )
- (4) Initial temperature.....( $IT = 190^\circ$ )
- (5)  $j = 1.41$ .

Find temperature,  $CT'$ , at which center of can will be 160 ( $x'$ ) minutes after beginning of process.

## Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1 gives  $f_h = 195$  minutes for No. 10 cans.
3.  $I = RT - IT = 250^\circ - 190^\circ = 60^\circ$ .
4.  $jI = 1.41 \times 60^\circ = 84.6^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $jI = 84.6^\circ$ ,  $B''_k = 2.927$  minutes.
6.  $\frac{x'}{f_h} = \frac{160}{195} = 0.82$  minute.
7.  $B'_k = B''_k - \frac{x'}{f_h} = 2.927 - 0.820 = 2.107$  minutes.

NOTE A: If  $B'_k$  were found to be negative (step 7), it would indicate that  $RT - CT'$  is less than  $0.1^\circ$ , i. e., that  $CT' = RT = 250^\circ$ . (approx.).

8. On chart 4; find, for  $B'_k = 2.107$  minutes,  $g' = 12.8^\circ$ .
9.  $CT' = RT - g' = 250^\circ - 12.8^\circ = 237.2^\circ =$  temperature at center of can 160 minutes after beginning of process. (See curves V, chart 7, sections A and A').

## PROBLEM VI-A

Simple process. Calculation of the amount of lethal heat at center of can up to a given time, expressed as percentage of the heat necessary to sterilize; when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2. ( $RT - CT'$ ) is greater than  $0.1^\circ$  (see note C).

## Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....( $F = 13$  minutes)
- (5) Retort temperature.....( $RT = 250^\circ$ )
- (6) Initial temperature.....( $IT = 170^\circ$ )
- (7) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .

Find percentage ( $P'$ ) of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to 110 ( $x'$ ) minutes after beginning of process.

NOTE A: Instead of  $x'$ , the value of  $CT'$  (temperature at center of can  $x'$  minutes after beginning of process) may be specified. If  $CT'$  were specified, the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note B.



Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1 gives  $f_h = 195$  minutes for No. 10 cans.
3.  $I = RT - IT = 250^\circ - 170^\circ = 80^\circ$ .
4.  $jI = 1.41 \times 80^\circ = 112.8^\circ$ .

NOTE B: Steps 5—8, below, are in accordance with solution of problem V (steps 5—8). If value of  $CT'$  were given as a condition of the problem instead of  $x'$ ; these steps would be replaced by the simple step 4a:  $g' = RT - CT' = 250^\circ - CT'$ .

5. On chart 4; find, for  $jI = 112.8^\circ$ ,  $B'_k = 3.06$  minutes.

6.  $\frac{x'}{f_h} = \frac{110}{195} = 0.565$  minute.

7.  $B'_k = B''_k - \frac{x'}{f_h} = 3.060 - 0.565 = 2.495$  minutes.

NOTE C: If  $B'_k$  were found to be negative (step 7), it would indicate that  $RT - CT'$  is less than  $0.1^\circ$ , in which case, the solution from this point would follow that of problem VI-B (steps 8—20).

8. On chart 4; find, for  $B'_k = 2.495$  minutes,  $g' = 31.0^\circ$ .
9. Use equation (3):

$$P'_c = 100A'_c = 100 \frac{f_h}{F} Y' \quad (3)$$

10.  $m + g = RT - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$ .

11. On chart 5, on curve representing  $z = 18^\circ$  and  $m + g = 180^\circ$ ; find, for  $g' = 31.0^\circ$ ,  $Y'_{220} = 0.0000323$ .

12. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 250^\circ$  on scale B,  $Z' = 46.4$ .

13.  $Y' = Z' Y'_{220} = 46.4 \times 0.0000323 = 0.0015$ .

14.  $\frac{f_h}{F} = \frac{195}{13} = 15.0$ .

15.  $A'_c = \frac{f_h}{F} Y' = 15.0 \times 0.0015 = 0.0225$ .

16.  $P'_c = 100A'_c = 100 \times 0.0225 = 2.25$  = percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can in 110 minutes of heating. (See curves VI-A, chart 7, sections A and A').

NOTE D: If the desired percentage is to include effective lethal heat during cooling of can (assuming that water cooling of can begins  $x'$  (110) minutes after beginning of process), the solution is like that just given except that in place of equation (3) we have equation (4):

$$P' = 100A' = 100 \frac{f_h Y'}{F \rho'} \quad (4)$$

and in place of steps 15 and 16 are substituted the following 3 steps:

- 15a. On chart 6, on curve representing  $z = 18^\circ$ ,  $m + g = 180^\circ$ ; find, for  $g' = 31.0^\circ$ ,  $\rho' = 0.518$ .

- 16a.  $A' = \frac{A'_1}{\rho'} = \frac{0.0225}{0.518} = 0.0435$ .

- 17a.  $P' = 100A' = 100 \times 0.0435 = 4.35$  = percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can during 110 minutes of heating plus necessary time for cooling in water.

## PROBLEM VI-B

Simple process. Calculation of the amount of lethal heat at center of can up to a given time, expressed as percentage of heat necessary to sterilize; when

1. The heating curve is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and when
2. ( $RT - CT'$ ) is less than  $0.1^\circ$  (see note C).

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....( $F = 18$  minutes)
- (5) Retort temperature.....( $RT = 255^\circ$ )
- (6) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (7) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .

Find percentage ( $P'_c < .1$ ) of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to 15 ( $x'$ ) minutes after beginning of process.

NOTE A: Instead of  $x'$  the value of  $CT'$  (temperature at center of can  $x'$  minutes after beginning of process) may be specified. If  $CT'$  were specified, the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note B.

Solution:

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1; find  $f_h = 4.15$  for No. 2 can.
3.  $I = RT - IT = 250^\circ - 160^\circ = 95^\circ$ .
4.  $jI = 1.41 \times 95^\circ = 134^\circ$ .

NOTE B: Steps 5—7, below, are in accordance with solution of problem V (steps 5—7). If value of  $CT'$  were given as a condition of the problem instead of  $x'$ ; these steps would be replaced by the simple step:

$$4a. \quad g' = RT - CT' = 255^\circ - CT'$$

Then, the solution would proceed according to either the method given below or the method of problem VI-A, the choice of method depending upon whether  $RT - CT'$  is less than or greater than  $0.1^\circ$ .

5. On chart 4; find, for  $jI = 134^\circ$ ,  $B''_k = 3.128$  minutes.
6.  $\frac{x'}{f_h} = \frac{15}{4.15} = 3.615$  minutes.
7.  $B'_k = B''_k - \frac{x'}{f_h} = 3.128 - 3.615 = -0.487$  minute.

NOTE C: The fact that  $B'_k$  is negative indicates that  $RT - CT'$  is less than  $0.1^\circ$ . If  $B'_k$  were found to be positive, it would show that  $RT - CT'$  is greater than  $0.1^\circ$ , in which case, the solution from this point would be like that of problem VI-A (steps 8—16).

8. Use equation (5):

$$P'_{c < .1} = 100A'_{c < .1} = 100 \left[ \frac{f_h Y'_{.1}}{F} + \frac{B'_{< .1}}{U} \right] \quad (5)$$

9.  $m+g = RT - CW = 255^\circ - 70^\circ = 185^\circ$ .

10. On chart 5, on curve  $z = 18^\circ$  [interpolating for  $m+g = 185^\circ$ ]; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $Y'_{220 .1} = 0.0353$ .

11. On chart 2, on curve  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 255^\circ$  on scale B,  $Z'_{.1} = 87.6$ .

12.  $Y'_{.1} = Z'_{.1} Y'_{220 .1} = 87.6 \times 0.0353 = 3.092$ .

13.  $B'_{< .1} = -f_h B'_k = -4.15 \times (-0.487) = 2.02$ .

14. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 255^\circ$  on scale A,  $F_i = 0.532$  minute.

15.  $U = FF_i = 18 \times 0.532 = 9.6$  minutes.

16.  $\frac{B'_{< .1}}{U} = \frac{2.02}{9.6} = 0.211$ .

17.  $\frac{f_h}{F} = \frac{4.15}{18} = 0.23$ .

18.  $\frac{f_h}{F} Y'_{.1} = 0.23 \times 3.092 = 0.711$ .

19.  $A'_{c < .1} = \frac{f_h}{F} Y'_{.1} + \frac{B'_{< .1}}{U} = 0.711 + 0.211 = 0.922$ .

20.  $P'_{c < .1} = 100A'_{c < .1} = 100 \times 0.922 = 92.2$  = percentage of lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can in 15 minutes of heating. (See curves VI-B, chart 7.)

NOTE D: If the desired percentage is to include effective lethal heat during cooling of can (assuming that water cooling begins  $x'$  [15] minutes after beginning of process), the solution is like that just given except that in place of equation (5) we have equation (6):

$$P'_{c < .1} = 100A'_{c < .1} = 100 \left[ \frac{f_h Y'_{.1}}{F \rho_{.1}} + \frac{B'_{< .1}}{U} \right] \quad (6)$$

and in place of steps 19—20 are substituted the following 4 steps:

19a. On chart 6, interpolating for curve representing  $z = 18^\circ$ ,  $m+g = 185^\circ$ ; find, for  $g' = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{.1} = 0.946$ .

20a. From steps 18 and 19a;  $\frac{f_h Y'_{.1}}{F \rho_{.1}} = \frac{0.711}{0.946} = 0.751$ .

21a.  $A'_{c < .1} = \frac{f_h Y'_{.1}}{F \rho_{.1}} + \frac{B'_{< .1}}{U} = 0.751 + 0.211 = 0.962$ .

22a.  $P'_{c < .1} = 100A'_{c < .1} = 100 \times 0.962 = 96.2$  = percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can during 15 minutes of heating plus necessary time for cooling in water.

## II

SYMBOLS USED IN CLASS 1, GROUP 2, PROBLEMS VII-A TO XII-B,  
INCLUSIVE. SIMPLE PROCESS; BROKEN LOGARITHMIC  
HEATING CURVE

---

THE SYMBOLS AND DEFINITIONS GIVEN BELOW REFER TO THE PROCESS THAT IS BEING CALCULATED. ALL SYMBOLS USED IN THE PROBLEMS, TO WHICH IS APPENDED THE SUBSCRIPT,  $a$ , ARE DEFINED AS GIVEN BELOW FOR THE SAME SYMBOLS WITHOUT THIS SUBSCRIPT; BUT THEY REFER, NOT TO THE PROCESS BEING CALCULATED, BUT TO A GIVEN PROCESS, AN EQUIVALENT OF WHICH IS BEING CALCULATED.

---

- $A'_{bh}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $A'_{bh2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{bh}$  or  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were  $f_2$ .
- $A'_{h1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperatures  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $A'_{h2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $A''_{h2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{h2}$  or  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $A'_{h2.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.



- $A''_{h2 .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $A'_{h2 <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{h2 <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $A''_{h2 <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{h2 <.1}$  or  $g'_{h2 <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $A_{cbh}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $A_{cbh} = \rho_{bh}$ .
- $A'_{cbh}$  — $[= \rho'_{bh} A'_{bh}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $A_{cbh2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $A'_{cbh2}$  — $[= \rho_{bh2} A'_{bh2}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $A_{ch1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $A_{ch1} = \rho_{h1}$ .
- $A'_{ch1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $A_{ch2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $A'_{ch2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $A''_{ch2}$  — $[= \rho_{h2} A''_{h2}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{h2}$  or  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .

- $A_{ch2 .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $A'_{ch2 .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $A''_{ch2 .1}$  — $[=\rho_{h2 .1} A''_{h2 .1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $A_{ch2 <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h2 <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $A'_{ch2 <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{h2 <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $A''_{ch2 <.1}$  — $[=\rho_{h2 .1} A''_{h2 <.1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h2 <.1}$  or  $g'_{h2 <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $a$  —Subscript used with symbols when they refer to a given process, an equivalent of which is being calculated.
- $B_{Bh}$  —Length of process in minutes.
- $B_{bh}$  — $[=f_2 B_{kbh}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $B'_{bh}$  — $[=f_2 B'_{kbh}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $B_{bh1}$  — $[=f_{h1} B_{kbh}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were  $f_{h1}$ .
- $B'_{bh1}$  — $[=f_{h1} B'_{kbh}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were  $f_{h1}$ .

- $B_{h1}$  — $[=f_{h1}B_{kh1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_{h1}$ .
- $B'_{h1}$  — $[=f_{h1}B'_{kh1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_{h1}$ .
- $B_{h2}$  — $[=f_2B_{kh2}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $B'_{h2}$  — $[=f_2B'_{kh2}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $B_{h2 < .1}$  — $[=f_2B_{kh2 < .1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below retort temperature to  $g_{h2 < .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $B'_{h2 < .1}$  — $[=f_2B'_{kh2 < .1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below retort temperature to  $g'_{h2 < .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $B''_h$  — $[=f_{h1}B''_{kh}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) if the slope of the heating curve (except for the initial lag) were constant and equal to  $f_{h1}$ .
- $B''_{oh}$  — $[=f_{h1}B''_{koh}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1 j$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) if the slope of the heating curve (except for the initial lag) were constant and equal to  $f_{h1}$ .
- $B_{kbh}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_2=1$ .
- $B'_{kbh}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_2=1$ .
- $B_{kh1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) if the slope of the heating curve were constant and equal to 1.
- $B'_{kh1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) if the slope of the heating curve were constant and equal to 1.



- $B_{kh2}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_2 = 1$ .
- $B'_{kh2}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_2 = 1$ .
- $B_{kh2} < .1$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below retort temperature to  $g_{h2} < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_2 = 1$ .
- $B'_{kh2} < .1$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below retort temperature to  $g'_{h2} < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ) when  $f_2 = 1$ .
- $B''_{kh}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve (except for the initial lag) were constant and equal to 1.
- $B''_{koh}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) to  $0.1 j$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) if the slope of the heating curve (except for the initial lag) were constant and equal to 1.
- $C_{bh}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions,  $t_{bh} = 1$  and slope of heating curve equals 1.
- $C'_{bh}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming conditions,  $t'_{bh} = 1$  and slope of heating curve equals 1.
- $C_{h1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming the conditions,  $t_{bh} = 1$  and slope of the heating curve equals 1.
- $C'_{h1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming the conditions,  $t'_{h1} = 1$  and slope of heating curve equals 1.



- $C_{h2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g_{h2}$  or  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), assuming the conditions,  $t_{h2}=1$  or  $t'_{h2}=1$  and slope of heating curve is constant and equal to 1.
- $C_{h2 .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), assuming the conditions,  $t_{h2 .1} (=t'_{h2 .1})=1$  and slope of heating curve is constant and equal to 1.
- $C_{h2 <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g_{h2 <.1}$  or  $g'_{h2 <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ), assuming the conditions,  $t_{h2 <.1}$  or  $t'_{h2 <.1}=1$  and slope of heating curve is constant and equal to 1.
- $CT_{bh}$  —Temperature at center of can at instant of break in heating curve when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of break in the heating curve, would be just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $CT'_{bh}$  —Temperature at center of can at instant of break in heating curve when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of break in the heating curve, would be either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $CT_{h1}$  — $[=RT-g_{h1}]$ —Temperature at center of can at the instant before the break in the heating curve when this temperature is  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $CT'_{h1}$  — $[=RT-g'_{h1}]$ —Temperature at center of can at the instant before the break in the heating curve when this temperature is  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $CT_{h2}$  — $[=RT-g_{h2}]$ —Temperature at center of can at the instant after the break in the heating curve when this temperature is  $g_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $CT'_{h2}$  — $[=RT-g'_{h2}]$ —Temperature at center of can at the instant after the break in the heating curve when this temperature is  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $CT_{Mh}$  —Maximum temperature attained at center of can when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $CW$  —Temperature of cooling water.
- $F$  —Number of minutes required to destroy organism at  $250^\circ$ .
- $F_i$  — $\left[=\frac{U}{F}\right]$ —Number of minutes required to destroy organism at retort temperature ( $RT$ ) when  $F=1$ .

- $F_o$  —The “order” of a process; representing the number of minutes required to destroy organism at  $250^\circ$  when  $z$  (of the real or the assumed thermal death time curve) equals  $18^\circ$ .  $F_o$  serves as a standard by means of which the sterilizing values of different processes may be compared. A “process of order, 10,” for instance, is a process which, theoretically, gives 100 per cent sterilization when calculated on the basis of a thermal death time curve passing through the point, 10 minutes,  $250^\circ$ , and having a slope,  $z$ , of  $18^\circ$ .
- $f_{h1}$  —Represents slope of heating curve before point of break in the curve.
- $f_2$  —Represents slope of heating curve after point of break in the curve.
- $f_{hh}$  — $\left[ = \frac{f_2}{V_h} \right]$  —The pseudo-slope of a heating curve that has a break.
- $g_{bh}$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and temperature at center of can at instant of break in heating curve when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of break in heating curve, would be just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g'_{bh}$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and the temperature at center of can at instant of break in heating curve when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of break in heating curve, would be either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g_{h1}$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process when this temperature is reached before the break in heating curve.
- $g'_{h1}$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant before the break in heating curve when the process (heating and cooling portions combined) with steam turned off and water cooling begun at the given instant, is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g_{h2}$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process when this temperature is reached after the break in heating curve.
- $g'_{h2}$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant after the break in heating curve when the process (heating and cooling portions combined) with steam turned off and water cooling begun at the given instant, is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.

- $g_{h2} < .1$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process when the difference between this temperature and retort temperature ( $RT$ ) is less than  $0.1^\circ$ .
- $g'_{h2} < .1$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant when the difference between this temperature and retort temperature ( $RT$ ) is less than  $0.1^\circ$  and when the process (heating and cooling portions combined) with steam turned off and water cooling begun at the given instant is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g_e$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and the maximum temperature the center of the can would reach in a process, which (heating and cooling portions combined) would be just sufficient to sterilize the food in the cans, if the heating curve did not break but had a constant slope ( $f_{h1}$ ); when this difference is greater than  $0.1^\circ$ .
- $g_e .1$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and the maximum temperature the center of the can would reach in a process which (heating and cooling portions combined) with steam turned off and water cooling begun at the given instant, would be either greater than or less than sufficient to sterilize the food in the cans, if the heating curve did not break but had a constant slope ( $f_{h1}$ ); when this difference is less than  $0.1^\circ$ .
- $h_h$  —The number of minutes required to complete a process after the temperature at center of can reaches  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $h_h = B_{h2} < .1$ .
- $I$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and initial temperature ( $IT$ ).
- $IT$  —Initial temperature of can.
- $j$  —An arbitrary factor, which, when multiplied by  $I$ , designates the point of intersection of the vertical line representing the beginning of a process with the extension of the straight portion of the semi-log heating curve, when no time is consumed in bringing the retort to processing temperature.  $j$  has a similar application with reference to the cooling curve when it is multiplied by the quantity,  $m_h$ . See paragraphs 5 and 6 of Introduction.
- $m_h$  —Difference in degrees between cooling water temperature ( $CW$ ) and the maximum temperature attained at center of can.
- $m+g$  —Difference in degrees between retort temperature ( $RT$ ) and cooling water temperature ( $CW$ ).
- $P'_{bh}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process, in which the can attains temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).



- $P'_{bh2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{bh}$  or  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were  $f_2$ .
- $P'_{h1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $P'_{h2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $P''_{h2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{h2}$  or  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $P'_{h2 .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $P''_{h2 .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $P'_{h2 < .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{h2 < .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $P''_{h2 < .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g_{h2 < .1}$  or  $g'_{h2 < .1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $P_{c bh}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).  $P_{c bh} = 100\rho_{bh}$ .
- $P'_{c bh}$  — $[=\rho'_{bh}P'_{bh}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).



- $P_{cbh2}$  — $[=\rho_{bh2}P_{bh2}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were  $f_2$ .
- $P'_{cbh2}$  — $[=\rho'_{bh2}P'_{bh2}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were  $f_2$ .
- $P_{ch1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).  $P_{ch1}=100\rho_{h1}$ .
- $P'_{ch1}$  — $[=\rho'_{h1}P'_{h1}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $P_{ch2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $P'_{ch2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $P''_{ch2}$  — $[=\rho_{h2}P''_{h2}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{h2}$  or  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $P_{ch2 .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $P'_{ch2 .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $P''_{ch2 .1}$  — $[=\rho_{h2 .1}P'_{h2 .1}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .
- $P_{ch2 <.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h2 <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).
- $P'_{ch2 <.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{h2 <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ).

$P''_{ch2} < .1$  — [ $= \rho_{h2} .1 P''_{h2} < .1$ ] — The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{h2} < .1$  or  $g'_{h2} < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ), if the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .

$RT$  — Retort temperature.

$\rho_{bh}$  — The fraction of the total lethal value of a process, which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $\rho_{bh} = A_{cbh}$ .

$\rho'_{bh}$  — The fraction of the total lethal value of a process which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$\rho_{bh2}$  — The fraction of the total lethal value of a process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) and the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .

$\rho'_{bh2}$  — The fraction of the total lethal value of a process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) and the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .

$\rho_{h1}$  — The fraction of the total lethal value of a process, which is represented by the heating portion only, when the maximum temperature reached at center of can is  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $\rho_{h1} = A_{ch1}$ .

$\rho'_{h1}$  — The fraction of the total lethal value of a process, which is represented by the heating portion only, when the maximum temperature reached at center of can is  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$\rho_{h2}$  — The fraction of the total lethal value of a process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $g_{h2}$  or  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ), and the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .

$\rho_{h2} .1$  — The fraction of the total lethal value of a process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were 0.1,  $g_{h2} < .1$ , or  $g'_{h2} < .1$  degree below retort temperature ( $RT$ ) and the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_2$ .

- $\rho_{\epsilon}$  —The fraction of the total lethal value of the process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $g_{\epsilon}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) and the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_{h1}$ .
- $\rho_{\epsilon < .1}$  —The fraction of the total lethal value of a process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $g_{\epsilon < .1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ) and the slope of the heating curve were constant and equal to  $f_{h1}$ .
- $t_{bh}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t'_{bh}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t_{h1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t'_{h1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t_{h2}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t'_{h2}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t_{h2 .1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $0.1^{\circ}$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans if the maximum temperature attained at center of can is  $0.1^{\circ}$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $t'_{h2 .1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $0.1^{\circ}$  below retort temperature ( $RT$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans if the maximum temperature attained at center of can is  $0.1^{\circ}$  below retort temperature ( $RT$ ).
- $t_{\epsilon}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_{\epsilon}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).
- $t_{\epsilon < .1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_{\epsilon .1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$$\Theta_{\epsilon} = \frac{\log^{-1} \left\{ 10^{\frac{f_{h1}}{f_2}} \log \frac{g_{bh}}{g_{\epsilon}} \right\}}{\log^{-1} \left\{ 10^{\frac{f_{h1}}{f_2}} \log \frac{g_{bh}}{g_{\epsilon}} \right\} + \rho_{\epsilon} - 1}$$

- Factor used in calculating a process when there is a break in the heating curve.  $\Theta_{\epsilon}$  makes calculated process values continuous over the point of break in the heating curve by producing continuity in the slope values of cooling curves over this point.

$\Theta_{\epsilon < .1}$ 

$$= \frac{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right\} \right]}{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right\} + \rho_{\epsilon < .1} - 1 \right]}$$

- Factor used in calculating a process when there is a break in the heating curve.  $\Theta_{\epsilon < .1}$  makes calculated process values continuous over the point, of break in the heating curve by producing continuity in the slope values of cooling curves over this point.

 $\Theta_{h2}$ 

$$= \frac{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_{h2}} \right\} \right]}{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_{h2}} \right\} + \rho_{h2} - 1 \right]}$$

- Factor used in calculating the lethal value of a given broken heating curve to place the calculation onto the basis of continuous process values at the point of break in heating curve.

 $\Theta_{h2 < .1}$ 

$$= \frac{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_{h2 < .1}} \right\} \right]}{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_{h2 < .1}} \right\} + \rho_{h2 < .1} - 1 \right]}$$

- Factor used in calculating the lethal value of a given broken heating curve to place the calculation onto the basis of continuous process values at the point of break in heating curve.

 $\Theta_a$ 

$$= \frac{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_a} \right\} \right]}{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_a} \right\} + \rho_a - 1 \right]}$$

- Factor used in calculating the value of  $F$  for a given process when there is a break in the heating curve.  $\Theta_a$  makes the values of  $F$  continuous over the point of break in the heating curve by producing continuity in the slope values of cooling curves over this point.

 $\Theta_{a < .1}$ 

$$= \frac{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_{h2 < .1a}} \right\} \right]}{\left[ \log^{-1} \left\{ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bh}}{g_{h2 < .1a}} \right\} + \rho_{h2 < .1a} - 1 \right]}$$

- Factor used in calculating the value of  $F$  for a given process when there is a break in the heating curve.  $\Theta_{a < .1}$  makes the values of  $F$  continuous over the point of break in the heating curve by producing continuity in the slope values of cooling curves over this point.

 $U$ 

- Number of minutes necessary to destroy organism at retort temperature ( $RT$ ).



$V_h$  —  $\left[ \frac{f_2 Y_{h2}}{F \rho_{h2}} \right]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can in a given process—heating and cooling—; if slope of heating curve were  $f_2$  (and constant), retort temperature were  $RT$ , and the maximum temperature attained at center of can were the same as that which must be attained for sterility in the broken heating curve process being calculated, in which the slope of the heating curve after the break is represented by  $f_2$ .  $V_h$ , divided into  $f_2$ , gives the pseudo-slope:

$$f_{hh} \left[ = \frac{f_2}{V_h} = \frac{F \rho_{h2}}{Y_{h2}} \right]$$

In problems, the value of  $V_h$  is obtained from the formula:

$$V_h = 1 + \Theta_e \frac{(f_2 - f_{h1}) Y'_{bh}}{F}$$

$W, X$  — Symbols representing canned foods.

$x_{bh}$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$x'_{bh}$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$x_{ch}$  —Number of minutes after break in heating curve necessary to hold can at retort temperature ( $RT$ ) to give a sterilizing process when the difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is not less than  $0.1^\circ$ .

$x_{ch} < .1$  —Number of minutes after break in heating curve necessary to hold can at retort temperature ( $RT$ ) to give a sterilizing process when the difference between retort temperature and the maximum temperature attained at center of can is less than  $0.1^\circ$ .

$x_{h1}$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$x'_{h1}$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

$x_{h2}$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g_{h2}$  or  $g_{h2} < .1$  degrees below retort temperature ( $RT$ ). By definition,  $x_{h2} = x'_{bh} + x_{ch}$ .

$x'_{h2}$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g'_{h2}$  or  $g'_{h2} < .1$  degrees below retort temperature ( $RT$ ).

- $Y_{bh}$  — [=  $Z_{bh} Y_{220\ bh}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions,  $F=1$  and slope of heating curve equals 1.  $RT$  has any given value.
- $Y'_{bh}$  — [=  $Z'_{bh} Y'_{220\ bh}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $F=1$  and slope of heating curve equals 1.  $RT$  has any given value.
- $Y_{h1}$  — [=  $Z_{h1} Y_{220\ h1}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions,  $F=1$  and slope of heating curve equals 1.  $RT$  has any given value.
- $Y'_{h1}$  — [=  $Z'_{h1} Y'_{220\ h1}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions,  $F=1$  and slope of heating curve equals 1.  $RT$  has any given value.
- $Y_{h2}$  — [=  $Z_{h2} Y_{220\ h2}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can, up to the time the can attained temperature  $g_{h2}$  or  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions,  $F=1$  and slope of heating curve is constant and equal to 1.  $RT$  has any given value.
- $Y_{h2\ .1}$  — [=  $Z_{h2\ .1} Y_{220\ h2\ .1}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature,  $0.1^\circ$  below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions,  $F=1$  and slope of heating curve is constant and equal to 1.  $RT$  has any given value.
- $Y_{h2\ <.1}$  — [=  $Z_{h2\ <.1} Y_{220\ h2\ <.1}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{h2\ <.1}$  or  $g'_{h2\ <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $F=1$  and slope of heating curve is constant and equal to 1.  $RT$  has any given value.
- $Y_{\epsilon}$  — [=  $Z_{\epsilon} Y_{220\epsilon}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{\epsilon}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , and slope of heating curve equals 1.  $RT$  has any given value.
- $Y_{\epsilon\ <.1}$  — [=  $Z_{\epsilon\ <.1} Y_{220\epsilon\ <.1}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{\epsilon\ <.1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , and slope of heating curve equals 1.  $RT$  has any given value.

- $Y_{220\ bh}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions  $F=1$ , slope of heating curve equals 1, and  $RT=220^\circ$ .
- $Y'_{220\ bh}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{bh}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions  $F=1$ , slope of heating curve equals 1, and  $RT=220^\circ$ .
- $Y_{220\ h1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions  $F=1$ , slope of heating curve equals 1, and  $RT=220^\circ$ .
- $Y'_{220\ h1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{h1}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions  $F=1$ , slope of heating curve equals 1, and  $RT=220^\circ$ .
- $Y_{220\ h2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{h2}$  or  $g'_{h2}$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions  $F=1$ , slope of heating curve is constant and equal to 1, and  $RT$  equals  $220^\circ$ .
- $Y_{220\ h2\ .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $0.1^\circ$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions  $F=1$ , slope of heating curve is constant and equal to 1, and  $RT$  equals  $220^\circ$ .
- $Y_{220\ h2\ <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{h2\ <.1}$  or  $g'_{h2\ <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions,  $F=1$ , slope of heating curve is constant and equal to 1, and  $RT=220^\circ$ .
- $Y_{220\epsilon}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_\epsilon$  degrees below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions  $F=1$ , slope of heating curve is constant and equal to 1, and  $RT=220^\circ$ .
- $Y_{220\epsilon\ <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{\epsilon\ <.1}$  degree below retort temperature ( $RT$ ); assuming conditions  $F=1$ , slope of heating curve is constant and equal to 1, and  $RT=220^\circ$ .
- $y_{h1}$  —The temperature coordinate of the portion of the heating curve preceding the break. It represents the number of degrees to retort temperature ( $RT$ ).

- $y_{h2}$  —The temperature coordinate of the portion of the heating curve following the break. It represents the number of degrees to retort temperature ( $RT$ ).
- $Z_{bh}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ bh}$  to a value ( $Y_{bh}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{bh}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $Z'_{bh}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y'_{220\ bh}$  to a value ( $Y'_{bh}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z'_{bh}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $Z_{h1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ h1}$  to a value ( $Y_{h1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{h1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $Z'_{h1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y'_{220\ h1}$  to a value ( $Y'_{h1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z'_{h1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $Z_{h2}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ h2}$  to a value ( $Y_{h2}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{h2}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $Z_{h2\ .1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ h2\ .1}$  to a value ( $Y_{h2\ .1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{h2\ .1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $Z_{h2\ <.1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ h2\ <.1}$  to a value ( $Y_{h2\ <.1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{h2\ <.1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $Z_\epsilon$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\epsilon}$  to a value ( $Y_\epsilon$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_\epsilon$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $Z_{\epsilon\ <.1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\epsilon\ <.1}$  to a value ( $Y_{\epsilon\ <.1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{\epsilon\ <.1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ) \div z$ .
- $z$  —Represents slope of thermal death time curve.



## PROBLEM VII-A

Simple process. Calculation of length of process when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ); and when
2.  $(RT - CT_{Mh})$  is greater than  $0.1^\circ$  (see note E).

Specifications:

- (1) Product.....( $W$ )
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....( $F = 4.4$  minutes)
- (5) Retort temperature.....( $RT = 250^\circ$ )
- (6) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 20$  minutes)  
[The value of  $CT'_{bh}$  may be specified instead of  $x'_{bh}$  (see notes A and B)]
- (7) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 27$  minutes)
- (8) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 120$  minutes)
- (9) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (10) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (11)  $j = 1.08$ .

Find process,  $B_{Bh}$ , necessary for sterilization.

$B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch}$ ;  $x_{ch}$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the break in heating curve.

NOTE A: If value of  $CT'_{bh}$  be given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (6) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note B.

Solution:

1.  $I = RT - IT = 250^\circ - 160^\circ = 90^\circ$ .
2.  $jI = 1.08 \times 90^\circ = 97.2^\circ$ .
3. On chart 4; find, for  $jI = 97.2^\circ$ ,  $B''_{kh} = 2.99$  minutes.

NOTE B: Steps 4—6, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in item (6) under Specifications, the value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $x'_{bh}$  for  $x'$ ,  $CT'_{bh}$  for  $CT'$ ,  $B'_{kbh}$  for  $B'_k$ , and  $f_{h1}$  for  $f_h$ .

4.  $\frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = \frac{20}{27} = 0.74$  minute.
5.  $B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 2.99 - 0.74 = 2.25$  minutes.
6. On chart 4; find, for  $B'_{kbh} = 2.25$  minutes,  $g'_{bh} = 17.6^\circ$ .
7. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 250^\circ$  on scale A,  $F_i = 1$  minute.
8.  $U = FF_i = 4.4 \times 1.0 = 4.4$  minutes.

9.  $m+g=RT-CW=250^{\circ}-70^{\circ}=180^{\circ}$ .
10.  $\frac{f_{h1}}{U}=\frac{27}{4.4}=6.14$ .
11. On chart 3, on curve for  $z=18^{\circ}$  and  $m+g=180^{\circ}$ ; find, for  $\frac{f_{h1}}{U}=6.14$ ,  $g_{\epsilon}=6.44^{\circ}$ .
12.  $\frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}}=\frac{17.6}{6.44}=2.73$ .

NOTE C: If  $g'_{bh}$  were equal to or less than  $g_{\epsilon}$ , that is, if  $\frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}}$  were equal to or less than unity, it would show that the end of the process comes at or before the break in heating curve. The problem would then be a simple heating curve problem, and, taking  $g=g_{\epsilon}$  from step 11, above, the solution would be completed by steps 10—12, problem I-A.

13.  $\text{Log } \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}} = \log 2.73 = 0.437$ .
14.  $\frac{f_{h1}}{f_2} = \frac{27}{120} = 0.225$ .
15.  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}} = 0.225 \times 0.437 = 0.0984$ .
16. Find  $V_h$  by equation (7):
- $$V_h = 1 \times \theta_{\epsilon} \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) \quad (7)$$
17. On chart 5, on curve,  $z=18^{\circ}$  and  $m+g=180^{\circ}$ ; find, for  $g'_{bh}=17.6^{\circ}$ ,  $Y'_{220bh}=0.00031$ .
18. On chart 2, on curve,  $z=18^{\circ}$ ; find, for  $RT=250^{\circ}$  on scale B,  $Z'_{bh}=46.4$ .
19.  $Y'_{bh}=Z'_{bh}Y_{220bh}=46.4 \times 0.00031=0.0144$ .
20.  $\frac{Y'_{bh}}{F} = \frac{0.0144}{4.4} = 0.00327$ .
21.  $f_2 - f_{h1} = 120 - 27 = 93$  minutes.
22.  $\frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 0.00327 \times 93.0 = 0.304$ .

NOTE D: If  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}}$  (step 15) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_{\epsilon}$  may be taken as 1.0, and steps 23—26, below, may be omitted. They are included here merely to give the method.

23. On chart 6, on curve representing  $z=18^{\circ}$  and  $m+g=180^{\circ}$ ; find, for  $g_{\epsilon}=6.44^{\circ}$ ,  $\rho_{\epsilon}=0.781$ .
24.  $10^{\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}}} = 10 \times 0.0984 = 0.984$ .
25.  $\text{Log}^{-1} \left[ 10^{\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}}} \right] = \log^{-1} 0.984 = 9.62$ .
26.  $\theta_{\epsilon} = \frac{\log^{-1} \left[ 10^{\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}}} \right]}{\log^{-1} \left[ 10^{\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}}} \right] + \rho_{\epsilon}} = \frac{9.62}{9.62 + 0.78 - 1} = \frac{9.62}{9.40} = 1.023$ .

$$27. \theta_e \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 1.023 \times 0.304 = 0.311.$$

$$28. V_h = 1 + \theta_e \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 1 + 0.311 = 1.311.$$

$$29. f_{hh} = \frac{f_2}{V_h} = \frac{120}{1.311} = 91.5.$$

$$30. \frac{f_{hh}}{U} = \frac{91.5}{4.4} = 20.8.$$

NOTE E: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{hh}}{U}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  be found less than 0.1, the method of problem VII-B (steps 30—42) should be followed from this point.

$$31. \text{ On chart 3, on curve for } m+g=180^\circ \text{ and } z=18^\circ; \text{ find, for } \frac{f_{hh}}{U}=20.8, \\ g_{h2}=13.12^\circ.$$

32. Find  $x_{ch}$  by equation (8):

$$x_{ch} = f_2 \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} \quad (8)$$

$$33. \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} = \log \frac{17.6}{13.12} = \log 1.34 = 0.1264.$$

$$34. x_{ch} = f_2 \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} = 120 \times 0.126 = 15.1 \text{ minutes.}$$

$$35. B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch} = 20.0 + 15.1 = 35.1 \text{ minutes} = \text{length of process. (See curves VIII-A, chart 7.)}$$

### PROBLEM VII-B

Simple process. Calculation of length of process when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ); and when
2.  $(RT - CT_{Mh})$  is less than  $0.1^\circ$ . (See note E.)

Specifications:

- (1) Product.....(W)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....( $F = 15$  minutes)
- (5) Retort temperature.....( $RT = 240^\circ$ )
- (6) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 8$  minutes)  
[The value of  $CT'_{bh}$  may be specified instead of  $x'_{bh}$  (see notes A and B)]
- (7) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 6$  minutes)
- (8) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 22.7$  minutes)
- (9) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (10) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (11)  $j = 1.41$ .

Find process,  $B_{bh}$ , necessary for sterilization.  $B_{bh} = x'_{bh} + x_{ch} < .1$ ;  $x_{ch} < .1$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the break in heating curve.

NOTE A: If value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (6) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note B.

Solution:

1.  $I = RT - IT = 240^\circ - 160^\circ = 80^\circ$ .
2.  $jI = 1.41 \times 80^\circ = 112.8^\circ$ .
3. On chart 4; find, for  $jI = 112.8^\circ$ ,  $B''_{kh} = 3.06$  minutes.

NOTE B: Steps 4—6, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in time (6) under Specifications, the value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $g'_{bh}$  for  $g'$ ,  $x'_{bh}$  for  $x'$ ,  $CT'_{bh}$  for  $CT'$ ,  $B'_{kbh}$  for  $B'_k$ , and  $f_{h1}$  for  $f_h$ .

4.  $\frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = \frac{8}{6} = 1.33$  minutes.
5.  $B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 3.06 - 1.33 = 1.73$  minutes.
6. On chart 4; find, for  $B'_{kbh} = 1.73$  minutes,  $g'_{bh} = 5.4^\circ$ .
7. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 240^\circ$  on scale A,  $F_i = 3.61$  minutes.
8.  $U = FF_i = 15 \times 3.61 = 54.1$  minutes.
9.  $m + g = RT - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ$ .
10.  $\frac{f_{h1}}{U} = \frac{6}{54.1} = 0.111$ .

NOTE C: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{h1}}{U}$  below approximately 0.575 give a value of  $g_\epsilon$  which is less than  $0.1^\circ$ . Thus,  $g_\epsilon$  is less than  $g'_{bh}$ . If  $g_\epsilon$  were greater than  $g'_{bh}$ , it would show that the end of the process comes before the break in heating curve. The problem would then be a simple heating curve problem; and, taking  $g = g_\epsilon$ , the solution would be completed by steps 10—12, problem I-A.

11.  $\frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} = \frac{5.4}{\text{less than } 0.1} = \text{greater than } 54$ .
12. Taking  $\frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} = 54.0$ ;  $\log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} = \log 54.0 = 1.733$ .
13.  $\frac{f_{h1}}{f_2} = \frac{6}{22.7} = 0.264$ .
14.  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} = 0.264 \times 1.733 = 0.458$ .
15. Find  $V_h$  by equation (7):

$$V_h = 1 + \theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) \quad (7)$$

16. On chart 5, on curve  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g'_{bh} = 5.4^\circ$ ,  $Y'_{220bh} = 0.00358$ .



17. On chart 2, on curve,  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT=240^\circ$  on scale B,  $Z'_{bh}=12.9$ .

18.  $Y'_{bh}=Z'_{bh}Y'_{220bh}=12.9\times 0.00358=0.0461$ .

19.  $\frac{Y'_{bh}}{F}=\frac{0.0461}{15}=0.00308$ .

20.  $f_2-f_{h1}=22.7-6.0=16.7$  minutes.

21.  $\frac{Y'_{bh}}{F}(f_2-f_{h1})=0.00308\times 16.7=0.0515$ .

NOTE D: If  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}}$  (step 14) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_{\epsilon < .1}$  may be taken as 1.0, and steps 22—25, below, may be omitted. They are included here merely to give the method.

22. On chart 6, interpolating for curve representing  $z=18^\circ$  and  $m+g=170^\circ$ ; find, for  $g=0.1^\circ$ ,  $\rho_{\epsilon < .1}(=\rho_{h2 .1})=0.946$ .

23.  $10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon}}=10\times 0.458=4.58$ .

24.  $\text{Log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right] = \text{log}^{-1} 4.58 = 38000$ .

25.  $\theta_{\epsilon < .1} = \frac{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right]}{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right] + \rho_{\epsilon < .1} - 1} = \frac{38,000}{38,000 + 0.946 - 1} = \frac{38,000}{37,999.946} = 1 \text{ (approx.)}$

26.  $\theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F}(f_2-f_{h2})=1.0\times 0.0515=0.0515$ .

27.  $V_h=1+\theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F}(f_2-f_{h1})=1.0\times 0.0515=1.0515$ .

28.  $f_{hh}=\frac{f_2}{V_h}=\frac{22.7}{1.0515}=21.58$ .

29.  $\frac{f_{hh}}{U}=\frac{21.58}{54.1}=0.399$ .

NOTE E: On chart 3, it is seen that, when  $z=18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{hh}}{U}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . The value of  $g_{h2 < .1}$ , therefore, cannot be taken from the curves of chart 3. If  $g$  were greater than  $0.1^\circ$ , we should continue from this point by method of problem VII-A (steps 31—35).

30. Find  $x_{ch < .1}$  by equation (9):

$$x_{ch < .1} = U \left[ 1 + \frac{\theta_{\epsilon < .1} Y'_{bh}(f_2-f_{h1})}{F} - \frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F \rho_{h2 .1}} \right] + f_2(1 + \log g'_{bh}) \quad (9)$$

31. On chart 5, on curve  $z=18^\circ$ ; find, for  $g=0.1^\circ$ ,  $Y'_{220 h2 .1}=0.0353$ .

32. On chart 2, on curve,  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT=240^\circ$  on scale B,  $Z_{h2 .1}=12.9$ .

33.  $Y_{h2 .1}=Z_{h2 .1}Y'_{220 h2 .1}=12.9\times 0.0353=0.4554$ .

34.  $\frac{f_2}{F}=\frac{22.7}{15}=1.513$ .

35.  $\frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F}=1.513\times 0.455=0.688$ .

36.  $\frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F \rho_{h2 .1}}=\frac{0.688}{0.946}=0.727$ .

37. From step 8,  $U = 54.1$  minutes; from step 25,  $\theta_{\epsilon} < .1 \frac{Y_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 0.052$ ; and

from step 35,  $\frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} = 0.727$ . Therefore,

$$U \left[ 1 + \frac{\theta_{\epsilon} < .1 Y_{bh} (f_2 - f_{h1})}{F} - \frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} \right] = 54.1 \{ 1 \times 0.052 - 0.727 \} \\ = 54.1 \times 0.325 = 17.6 \text{ minutes}$$

38. Taking  $g'_{bh}$  from step 6;  $\log g'_{bh} = \log 5.4 = 0.732$ .

39.  $1 + \log g'_{bh} = 1.0 + 0.732 = 1.732$ .

40.  $f_2 (1 + \log g'_{bh}) = 22.7 \times 1.732 = 39.3$  minutes.

41. From steps 29, 36, and 39:

$$x_{ch} < .1 = U \left[ 1 + \frac{\theta_{\epsilon} < .1 Y'_{bh} (f_2 - f_{h1})}{F} - \frac{f_2 Y_{h2} .1}{F \rho_{h2} .1} \right] + f_2 (1 + \log g'_{bh}) \\ = 17.6 + 39.3 = 56.9 \text{ minutes.}$$

42.  $B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch} < .1 = 8.0 + 56.9 = 64.9$  minutes = length of process. (See curves VII-B, chart 7, sections B and B'.)

### PROBLEM VIII-A

Simple process. Calculation of a process equivalent to a given process at a different retort temperature when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ); and when
2.  $RT - CT_{Mh}$  is greater than  $0.1^\circ$  (see notes F and O).

Specifications:

- (1) Product.....(W)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Retort temperature.....( $RT = 245^\circ$ )
- (5) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 20$  minutes)  
[The value of  $CT'_{bh}$  may be specified instead of  $x'_{bh}$  (see notes B and E)]
- (6) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 27$  minutes)
- (7) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 120$  minutes)
- (8) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (10)  $j = 1.08$ .
- (11) Process necessary for sterilization at another retort temperature.....  
.....( $B_{Bha} = 35$  minutes when  $RT_a = 250^\circ$ )

Find process,  $B_{Bh}$ , necessary for sterilization when processing temperature is  $245^\circ$ .  
 $B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch}$ ;  $x_{ch}$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the break in heating curve.

NOTE A: If a value of  $z$  is not specified [item (3) under Specifications], one may be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT'_{bh}$  be given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (5) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note E.

NOTE C: If the process [item (11) under Specifications] were a divided process, the method of solution would be that of problem XXI.

Solution:

NOTE D: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—32).

1.  $I_a = RT_a - IT = 250^\circ - 160^\circ = 90^\circ$ .
2.  $jI_a = 1.08 \times 90^\circ = 97.2^\circ$ .
3. On chart 4; find, for  $jI_a = 97.2^\circ$ ,  $B''_{kha} = 2.99$  minutes.

NOTE E: Steps 4—6, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in item (5) under Specifications, the value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $g'_{bh}$  for  $g'$ ,  $x'_{bh}$  for  $x'$ ,  $CT'_{bh}$  for  $CT'$ ,  $B'_{khh}$  for  $B'_k$ , and  $f_{h1}$  for  $f_h$ .

4.  $\frac{x'_{bha}}{f_{h1a}} = \frac{20}{27} = 0.74$  minute.
5.  $B'_{kba} = B''_{kha} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 2.99 - 0.74 = 2.25$  minutes.
6. On chart 4; find, for  $B'_{kba} = 2.25$  minutes,  $g'_{bha} = 17.6^\circ$ .
7. Find  $g_{h2a}$  (steps 8—12, below) by equation (10):
 
$$g_{h2a} = \log^{-1} \left( \log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_2} \right) \quad (10)$$
8.  $x_{cha} = B_{Bha} - x_{bh} = 35 - 20 = 15$  minutes.
9.  $\frac{x_{cha}}{f_{2a}} = \frac{15}{120} = 0.125$ .
10.  $\log g'_{bha} = \log 17.6 = 1.245$ .
11.  $\log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} = 1.245 - 0.125 = 1.12$ .
12.  $g_{h2a} = \log^{-1} \left( \log g_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_2} \right) = \log^{-1} 1.12 = 13.20^\circ$ .
13.  $\frac{g_{bha}}{g_{h2a}} = \frac{17.6}{13.2} = 1.332$ .

NOTE F: If  $g_{h2a}$  were found to be less than  $0.1^\circ$ , the solution from this point would be that of problem VIII-B (steps 14—75); for equation (12) (step 17, problem VIII-B) would be used to obtain value of  $F$  instead of equation (11) (step 17, below).

NOTE G: If  $g_{h2a}$  were found to be greater than or equal to  $g'_{bha}$ , that is, if  $\frac{g'_{bha}}{g_{h2a}}$  were less than or equal to unity, steps 14—32, below, would be replaced by steps 10—14, problem II-A, letting  $f_h = f_{h1}$ .

14.  $\log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} = \log 1.332 = 0.125$ .
15.  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} = \frac{27}{120} = 0.225$ .
16.  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} = 0.225 \times 0.125 = 0.0281$ .
17. Find  $F$  (steps 18—32, below) by equation (11):

$$F = \frac{f_{2a} Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} - \theta_a Y'_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) \quad (11)$$

18.  $(m+g)_a = RT_a - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$ .
19. On chart 5, on curve  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_a = 180^\circ$ ; find, for  $g_{h2a} = 13.2^\circ$ ,  $Y_{220\ h2a} = 0.000709$ ; and, for  $g'_{bha} = 17.6^\circ$ ,  $Y_{220\ bha} = 0.00031$ .
20. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_a = 250^\circ$  on scale B,  $Z_{h2a} (= Z'_{bha}) = 46.4$ .
21.  $Y_{h2a} = Z_{h2a} Y_{220\ h2a} = 46.4 \times 0.000709 = 0.03285$ .
22. On chart 6, on curve for  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_a = 180^\circ$ ; find, for  $g_{h2a} = 13.2^\circ$ ,  $\rho_{h2a} = 0.69$ .
23.  $\frac{Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} = \frac{0.0329}{0.69} = 0.0476$ .
24.  $\frac{f_{2a} Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} = 120 \times 0.0476 = 5.72$ .
25.  $Y'_{bha} = Z'_{bha} Y'_{220\ bha} = 46.4 \times 0.00031 = 0.0144$ .
26.  $f_{2a} - f_{h1a} = 120 - 27 = 93$  minutes.
27.  $Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h1a}) = 0.0144 \times 93 = 1.339$ .

NOTE H: If  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g_{bha}}{g_{h2a}}$  (step 16) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_a$  may be taken as 1, and steps 28—30, below, may be omitted.

28.  $10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} = 10.0 \times 0.0281 = 0.281$ .
29.  $\log^{-1} \left( 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} \right) = \log^{-1} 0.281 = 1.91$ .

$$30. \theta_a = \frac{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} \right]}{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g_{bha}}{g_{h2a}} \right] + \rho_{h2a} - 1} = \frac{1.91}{1.91 + 0.69 - 1} = \frac{1.91}{1.60} = 1.192$$

$$31. \theta_a Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h2a}) = 1.192 \times 1.339 = 1.598$$

32. From steps 17, 24, and 31:

$$F = \frac{f_{2a} Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} - \theta_a Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h2a}) = 5.72 - 1.598 = 4.12 \text{ minutes.}$$

NOTE I. Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (35 minutes at  $250^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with  $RT = 245^\circ$  to give an equivalent process. This part of the problem is analogous to problem VII-A.

NOTE J: If the process to be calculated were a divided process, the completion of the solution from this point should be according to the method of problem XX.

$$33. I = RT - IT = 245^\circ - 160^\circ = 85^\circ$$

$$34. jI = 1.08 \times 85^\circ = 91.8^\circ$$

$$35. \text{On chart 4; find, for } jI = 91.8^\circ, B''_{kh} = 2.964 \text{ minutes.}$$

NOTE K: Steps 36—38, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in item (5) under Specifications, the value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $g'_{bh}$  for  $g'$ ,  $x'_{bh}$  for  $x'$ ,  $CT'_{bh}$  for  $CT'$ ,  $B'_{kbh}$  for  $B'_k$ , and  $f_{h1}$  for  $f_h$ .



NOTE L: If it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for a different retort temperature, the values of  $f_{h1}$  and  $f_2$  will be different than the values of  $f_{h1a}$  and  $f_{2a}$  respectively. In this problem  $f_{h1}=f_{h1a}$  and  $f_2=f_{2a}$ .

$$36. \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 0.74 \text{ minute. (See step 4.)}$$

$$37. B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 2.964 - 0.74 = 2.224 \text{ minutes.}$$

$$38. \text{ On chart 4; find, for } B'_{kbh} = 2.224 \text{ minutes, } g'_{bh} = 16.6^\circ.$$

$$39. \text{ On chart 2, on curve } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT = 245^\circ \text{ on scale A, } F_i = 1.94 \text{ minutes.}$$

$$40. U = FF_i = 4.12 \times 1.94 = 7.99 \text{ minutes.}$$

$$41. m + g = RT - CW = 245^\circ - 70^\circ = 175^\circ.$$

$$42. \frac{f_{h1}}{U} = \frac{27}{7.99} = 3.38.$$

$$43. \text{ On chart 3, interpolating for curve for } m + g = 175^\circ \text{ and } z = 18^\circ; \text{ find, for } \frac{f_{h1}}{U} = 3.38, g_e = 3.85^\circ.$$

$$44. \frac{g'_{bh}}{g_e} = \frac{16.6}{3.85} = 4.31.$$

NOTE M: If  $g'_{bh}$  were equal to or less than  $g_e$ , that is, if  $\frac{g'_{bh}}{g_e}$  were equal to or less than unity, it would show that the end of the process comes at or before the break in heating curve. The problem would then be solved from this point as a simple heating curve problem by steps 10—12, problem I-A, taking  $g = g_e$  from step 43, above.

$$45. \text{ Log } \frac{g'_{bh}}{g_e} = \log 4.31 = 0.635.$$

$$46. \frac{f_{h1}}{f_2} = 0.225. \text{ (See step 15.)}$$

$$47. \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_e} = 0.225 \times 0.635 = 0.143.$$

$$48. \text{ Find } V_h \text{ by equation (7):}$$

$$V_h = 1 + \theta_e \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) \quad (7)$$

$$49. \text{ On chart 5, on curve representing } z = 18^\circ; \text{ interpolating for } m + g = 175^\circ; \text{ find, for } g'_{bh} = 16.6^\circ, Y'_{220 \text{ } bh} = 0.000372.$$

$$50. \text{ On chart 2, on curve } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT = 245^\circ \text{ on scale B, } Z'_{bh} = 24.4.$$

$$51. Y'_{bh} = Z'_{bh} Y'_{220 \text{ } bh} = 24.4 \times 0.000372 = 0.00908.$$

$$52. \frac{Y'_{bh}}{F} = \frac{0.00908}{4.13} = 0.0022.$$

$$53. f_2 - f_{h1} = 93 \text{ minutes. (See step 26.)}$$

$$54. \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 0.0022 \times 93 = 0.2044.$$

NOTE N: If  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon}$  (step 47) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_\epsilon$  may be taken as 1.0, and steps 55—58, below, may be omitted.

55. On chart 6, interpolating for curve representing  $z=18^\circ$  and  $m+g=175^\circ$ ; find, for  $g_\epsilon=3.85^\circ$ ,  $\rho_\epsilon=0.825$ .

$$56. 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} = 10 \times 0.143 = 1.43.$$

$$57. \text{Log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} \right] = \text{log}^{-1} 1.43 = 26.9.$$

$$58. \theta_\epsilon = \frac{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} \right]}{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} \right] + \rho_\epsilon - 1} = \frac{26.9}{26.9 + 0.825 - 1} = \frac{26.9}{26.725} = 1.007.$$

$$59. \theta_\epsilon \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 1.007 \times 0.2044 = 0.206.$$

$$60. V_h = 1 + \theta_\epsilon \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 1 + 0.206 = 1.206.$$

$$61. f_{hh} = \frac{f_2}{V_h} = \frac{120}{1.206} = 99.4.$$

$$62. \frac{f_{hh}}{U} = \frac{99.4}{7.99} = 12.45.$$

63. On chart 3, on curve for  $m+g=130^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find for  $\frac{f_{hh}}{U} = 12.45$ ,  $g_{h2 \ 130} = 10.69^\circ$ ; on curve for  $m+g=180^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f_{hh}}{U} = 12.45$ ,  $g_{h2 \ 180} = 10.15$ . Interpolating, for  $m+g=175^\circ$  and  $z=18^\circ$ ,  $g_{h2} = 10.20$ .

NOTE O: On chart 3, it is seen that, when  $z=18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{hh}}{U}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  were found less than  $0.1^\circ$ , the method of problem VII-B (steps 30—42) should be followed from this point. Since  $g$  is greater than  $0.1^\circ$ , steps 64—67, below, are analogous to steps 32—35 of problem VII-A.

64. Find  $x_{ch}$  by means of equation (7):

$$x_{ch} = f_2 \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} \quad (7)$$

$$65. \text{Log} \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} = \log \frac{16.6}{10.20} = \log 1.627 = 0.211.$$

$$66. x_{ch} = f_2 \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} = 120 \times 0.211 = 25.3 \text{ minutes.}$$

67.  $B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch} = 20.0 + 25.3 = 45.3 \text{ minutes} = \text{length of process.}$  (See curves VIII-A, chart 7, sections A and A'.)

## PROBLEM VIII-B

Simple process. Calculation of a process equivalent to a given process at a different retort temperature when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ); and when
2.  $(RT - CT_{Mh})$  is less than  $0.1^\circ$  (see notes F and O).

Specifications:

- (1) Product.....(*W*)
- (2) Size of can.....(*No.* 2)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Retort temperature.....( $RT = 245^\circ$ )
- (5) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 8$  minutes)  
[The value of  $CT'_{bh}$  may be specified instead of  $x'_{bh}$  (see notes B and E)]
- (6) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 6$  minutes)
- (7) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 22.7$  minutes)
- (8) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (10)  $j = 1.41$ .
- (11) Process necessary for sterilization at another retort temperature.....  
.....( $B_{Bha} = 65$  minutes when  $RT_a = 240^\circ$ )

Find process,  $B_{Bh}$ , necessary for sterilization when processing temperature is  $245^\circ$ .

$B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch} < .1$ ;  $x_{ch} < .1$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the break in heating curve.

NOTE A: If a value of  $z$  is not specified [item (3) under Specifications,] one may be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (5) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note E.

NOTE C: If the given process [item (11) under Specifications] were a divided process, the method of solution would be that of problem XXI.

Solution:

NOTE D: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—41).

1.  $I_a = RT_a - IT = 240^\circ - 160^\circ = 80^\circ$ .
2.  $jI_a = 1.41 \times 80^\circ = 112.8^\circ$ .
3. On chart 4; find, for  $jI_a = 112.8^\circ$ ,  $B''_{kha} = 3.062$  minutes.

NOTE E: Steps 4—6, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in item (5) under Specifications, the value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $g'_{bh}$  for  $g'$ ,  $x'_{bh}$  for  $x'$ ,  $CT'_{bh}$  for  $CT'$ ,  $B'_{khh}$  for  $B'_k$ , and  $f_{h1}$  for  $f_h$ .

4.  $\frac{x'_{bha}}{f_{h1a}} = \frac{8}{6} = 1.33$  minutes.
5.  $B'_{kbha} = B''_{kha} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 3.06 - 1.33 = 1.73$  minutes.
6. On chart 4; find, for  $B'_{kbha} = 1.73$  minutes,  $g'_{bha} = 5.4^\circ$ .
7. Find  $g_{h2a}$  (steps 8—12, below) by equation (10):

$$g_{h2a} = \log^{-1} \left( \log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} \right) \quad (10)$$

8.  $x_{cha} = B_{Bha} - x'_{bha} = 65.0 - 8.0 = 57.0$  minutes.
9.  $\frac{x_{cha}}{f_{2a}} = \frac{57.0}{22.7} = 2.509$ .
10.  $\log g'_{bha} = \log 5.4 = 0.732$ .
11.  $\log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} = 0.732 - 2.509 = -1.777 = \bar{2}.223$ .
12.  $g_{h2a} = \log^{-1} \left( \log g_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} \right) = \log^{-1} \bar{2}.223 = 0.0167^\circ$ .
13.  $\frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} = \frac{5.4}{0.0167} = 323.5$ .

NOTE F: It is noted that  $g_{h2a}$  is less than  $0.1^\circ$ . Thus, the symbol,  $g_{h2} < .1a$ , must be substituted for the symbol,  $g_{h2a}$ . If  $g_{h2a}$  were found to be greater than  $0.1^\circ$ , the solution from this point would be that of problem VIII-A (steps 14—67); for equation (11) (step 17, problem VIII-A) would be used to obtain the value of  $F$  instead of equation (12) (step 17, below).

NOTE G: If  $g_{h2a}$  were found to be equal to or greater than  $g'_{bha}$ , that is, if  $\frac{g'_{bha}}{g_{h2a}}$  were equal to or less than unity, steps 14—41, below, would be replaced by steps 8—14, of problem II-B, letting  $f_h = f_{h1}$ .

14.  $\log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} = \log 323.5 = 2.51$ .
15.  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} = \frac{6.0}{22.7} = 0.264$ .
16.  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} = 0.264 \times 2.51 = 0.662$ .
17. Find  $F$  (steps 18—41, below) by equation (12):

$$F = f_{2a} \left[ \frac{Y_{h2 .1a}}{\rho_{h2 .1a}} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_a}{z}} \right] - \theta_{a < .1} Y'_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) \quad (12)$$

18.  $(m+g)_a = RT_a - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ$ .
19. On chart 5, on curve  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $Y_{220 h2 .1a} = 0.0353$ .
20. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_a = 240^\circ$  on scale B,  $Z_{h2 .1a} = 12.9$ .
21.  $Y_{h2 .1a} = Z_{h2 .1a} Y_{220 h2 .1a} = 12.9 \times 0.0353 = 0.4554$ .
22. On chart 6, interpolating for curve,  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_a = 170^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{h2 .1a} (= \rho_{h2} < .1a) = 0.946$ .
23.  $\frac{Y_{h2 .1a}}{\rho_{h2 .1a}} = \frac{0.455}{0.946} = 0.4805$ .



$$24. \text{ From steps 11 and 12; } \log g_{h2} < .1a = \bar{2}.223 = -1.777.$$

$$25. 1 + \log g_{h2} < .1a = 1 + (-1.777) = 1 - 1.777 = -0.777.$$

$$26. 250^\circ - RT_a = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ.$$

$$27. \frac{250^\circ - RT_a}{z} = \frac{10^\circ}{18^\circ} = 0.556.$$

$$28. \text{Log}^{-1} \frac{250^\circ - RT_a}{z} = \log^{-1} 0.556 = 3.60.$$

$$29. \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_a}{z}} = \frac{-0.777}{3.60} = -0.216.$$

$$30. \frac{Y_{h2} .1a}{\rho_{h2} .1a} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_a}{z}} = 0.4805 - (-0.216) \\ = 0.4805 + 0.216 = 0.696.$$

$$31. f_2 \left[ \frac{Y_{h2} .1a}{\rho_{h2} .1a} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_a}{z}} \right] = 22.7 \times 0.696 = 15.799 \text{ minutes.}$$

$$32. \text{ On chart 5, on curve } z = 18^\circ; \text{ find, for } g'_{bha} = 5.4^\circ, Y'_{220 bha} = 0.00358.$$

$$33. \text{ On chart 2, on curve } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_a = 240^\circ \text{ on scale B, } Z'_{bha} = 12.9.$$

$$34. Y'_{bha} = Z'_{bha} Y'_{220 bha} = 12.9 \times 0.00358 = 0.0461.$$

$$35. f_{2a} - f_{h1a} = 22.7 - 6.0 = 16.7 \text{ minutes.}$$

$$36. Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h1a}) = 0.0461 \times 16.7 = 0.770.$$

NOTE H: If  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a}$  (step 16) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_a$  may be taken as 1, and steps 37—39, below, may be omitted. They are included here merely to give the method.

$$37. 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} = 10.0 = 0.662 = 6.62.$$

$$38. \text{Log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} \right] = \log^{-1} 6.62 = 4,596,000.$$

$$39. \theta_a < .1 = \frac{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} \right]}{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} \right] + \rho_{h2} < .1a - 1} = \frac{4,596,000}{4,596,000 + 0.946 - 1} \\ = \frac{4,596,000}{4,595,999.946} = 1.0.$$

$$40. \theta_a < .1 Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h1a}) = 1.0 \times 0.77 = 0.770.$$

$$41. \text{ From steps 17, 31, and 40;}$$

$$F = f_{2a} \left[ \frac{Y_{h2} .1a}{\rho_{h2} .1a} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_a}{z}} \right] - \theta_a < .1 Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h1a}) \\ = 15.799 - 0.770 = 15.029 \text{ minutes.}$$

NOTE I: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (65 minutes at  $240^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with  $RT = 245^\circ$  to give an equivalent process. This part of the problem is analogous to problem VII-B.

NOTE J: If the process to be calculated were a divided process, the completion of the solution from this point should be according to the method of problem XX.

$$42. I = RT - IT = 245^\circ - 160^\circ = 85^\circ.$$

$$43. jI = 1.41 \times 85^\circ = 119.8^\circ.$$

$$44. \text{On chart 4; find, for } jI = 119.8^\circ, B''_{kh} = 3.077 \text{ minutes.}$$

NOTE K: Steps 45—47, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in item (5) under Specifications, the value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $g'_{bh}$  for  $g'$ ,  $x'_{bh}$  for  $x'$ ,  $CT'_{bh}$  for  $CT'$ ,  $B'_{kbh}$  for  $B'_k$ , and  $f_{h1}$  for  $f_h$ .

NOTE L: If it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for a different retort temperature, the values of  $f_{h1}$  and  $f_2$  will be different than the values of  $f_{h1a}$  and  $f_{2a}$  respectively. In this problem,  $f_{h1} = f_{h1a}$  and  $f_2 = f_{2a}$ .

$$45. \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 1.33 \text{ minutes. (See step 4.)}$$

$$46. B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 3.08 - 1.33 = 1.75 \text{ minutes.}$$

$$47. \text{On chart 4; find, for } B'_{kbh} = 1.75 \text{ minutes, } g'_{bh} = 5.65^\circ.$$

$$48. \text{On chart 2, on curve } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT = 245^\circ \text{ on scale A, } F_i = 1.93 \text{ minutes.}$$

$$49. U = FF_i = 15.03 \times 1.93 = 29.0 \text{ minutes.}$$

$$50. m + g = RT - CW = 245^\circ - 70^\circ = 175^\circ.$$

$$51. \frac{f_{h1}}{U} = \frac{6.0}{29.0} = 0.207.$$

NOTE M: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{h1}}{U}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . Thus,  $g_e$  is less than  $g'_{bh}$ . If  $g_e$  were equal to or greater than  $g'_{bh}$  it would show that the end of the process comes at or before the break in heating curve. The problem would then be a simple heating curve problem; and, taking  $g = g_e$ , the solution would be completed by steps 10—12, problem I-A.

$$52. \frac{g'_{bh}}{g_e < .1} = \frac{5.65}{\text{less than } 0.1} = \text{greater than } 56.5.$$

$$53. \text{Log } \frac{g'_{bh}}{g_e < .1} = \log 56.5 = 1.752.$$

$$54. \frac{f_{h1}}{f_2} = 0.264. \text{ (See step 15.)}$$

$$55. \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_e < .1} = 0.264 \times 1.752 = 0.462.$$

$$56. \text{Find } V_h \text{ by equation (7):}$$

$$V_h = 1 + \theta_{e < .1} \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) \quad (7)$$

$$57. \text{On chart 5, on curve, } z = 18^\circ; \text{ find, for } g'_{bh} = 5.65^\circ, Y'_{220 bh} = 0.00334.$$

$$58. \text{On chart 2, on curve, } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT = 245^\circ \text{ on scale B, } Z'_{bh} = 24.4.$$

$$59. Y'_{bh} = Z'_{bh} Y'_{220 bh} = 24.4 \times 0.00334 = 0.0815.$$

$$60. \frac{Y'_{bh}}{F} = \frac{0.0815}{15.03} = 0.0054.$$

$$61. f_2 - f_{h1} = 16.7 \text{ minutes. (See step 35.)}$$

$$62. \frac{Y'_{bh}}{F}(f_2 - f_{h1}) = 0.0054 \times 16.7 = 0.0902.$$

NOTE N: If  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}}$  (step 55) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_{\epsilon < .1}$  may be taken as 1.0, and steps 63—66, below, may be omitted. They are included here merely to give the method.

63. On chart 6, interpolating for curve representing  $z = 18^\circ$  and  $m + g = 175^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{\epsilon < .1} (= \rho_{h2 .1}) = 0.9462$ .

$$64. 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} = 10 \times 0.462 = 4.62.$$

$$65. \text{Log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right] = \text{log}^{-1} 4.62 = 29,000.$$

$$66. \theta_{\epsilon < .1} = \frac{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right]}{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right] + \rho_{\epsilon < .1} - 1} = \frac{29,000}{29,000 + 0.9462 - 1} = \frac{29,000}{28,999.946} = 1.000.$$

$$67. \theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F}(f_2 - f_{h1}) = 1.0 \times 0.0902 = 0.0902.$$

$$68. V_h = 1 + \theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F}(f_2 - f_{h1}) = 1 + 0.0902 = 1.0902.$$

$$69. f_{hh} = \frac{f_2}{V_h} = \frac{22.7}{1.0902} = 20.8.$$

$$70. \frac{f_{hh}}{U} = \frac{20.8}{29.0} = 0.717.$$

NOTE O: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{hh}}{U}$  below about 0.575 give a value of  $g$  less than  $0.1^\circ$ . The fact that  $\frac{f_{hh}}{U}$  here equals 0.717 shows that; although in the given process of this problem, viz., 65 minutes at  $240^\circ$ , the value of  $g_{h2 < .1a}$  is less than  $0.1^\circ$ ; in the equivalent process at  $245^\circ$ , the length of which is being calculated,  $g_{h2}$  is greater than  $0.1^\circ$ . The solution from this point, therefore, will follow the method used in problem VII-A, steps 31—35, instead of that used in problem VII-B, steps 30—42.

71. On chart 3, on curve for  $m + g = 130^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $\frac{f_{hh}}{U} = 0.717$ ,  $g_{h2 \ 180} = 0.214^\circ$ ; and on curve for  $m + g = 180^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $\frac{f_{hh}}{U} = 0.717$ ,  $g_{h2 \ 180} = 0.203^\circ$ . Interpolating, for  $m + g = 175^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ,  $g_{h2} = 0.21^\circ$ .

72. Find  $x_{ch}$  by means of equation (7):

$$x_{ch} = f_2 \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} \quad (7)$$

$$73. \text{Log} \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} = \log \frac{5.65}{0.21} = \log 26.9 = 1.43.$$

$$74. x_{ch} = f_2 \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} = 22.7 \times 1.43 = 32.46 \text{ minutes.}$$

75.  $B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch} = 8.0 + 32.5 = 40.5$  minutes = length of process. (See curves VIII-B, chart 7, sections B and B'.)

# PROBLEM IX-A

Simple process. Calculation of effect of change in initial temperature upon time necessary for sterilization when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ); when
2. The time of occurrence of break is given [item (5) under Specifications]; and when
3.  $(RT-CT_{Mh})$  is greater than  $0.1^\circ$  (see notes E and K).

Specifications:

- (1) Product.....( $W$ )
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z=18^\circ$ )
- (4) Retort temperature.....( $RT=245^\circ$ )
- (5) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh}=20$  minutes)
- (6) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1}=27$  minutes)
- (7) Slope of heating curve after break.....( $f_2=120$  minutes)
- (8) Initial temperature.....( $IT=180^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW=70^\circ$ )
- (10)  $j=1.08$ .
- (11) Process necessary for sterilization at another initial temperature.....  
.....( $B_{Bha}=35$  minutes when  $IT_a=160^\circ$ )

Find process,  $B_{Bh}$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $180^\circ$ .

NOTE A: If a value of  $z$  is not specified [item (3) under Specifications], one may be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT_{bh}$  were given instead of that of  $x_{bh}$  [item (5) under Specifications], the method of solution of either problem IX-C, IX-D, or IX-E would be followed. The choice of method would depend upon whether or not one of the initial temperatures were higher than  $CT_{bh}$ ; and if so, which one.

NOTE C: If the given process [item (11) under Specifications] were a divided process, the method of solution would be that of problem XXI.  
Solution:

NOTE D: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—32). This is a repetition of steps 1—32 of problem VIII-A.

1.  $I_a = RT - IT_a = 250^\circ - 160^\circ = 90^\circ$ .
2.  $jI_a = 1.08 \times 90^\circ = 97.2^\circ$ .
3. On chart 4; find, for  $jI_a = 97.2^\circ$ ,  $B''_{kha} = 2.99$  minutes.
4.  $\frac{x'_{bha}}{f_{h1a}} = \frac{20}{27} = 0.74$  minute.
5.  $B'_{kbha} = B''_{ka} - \frac{x'_{bha}}{f_{h1a}} = 2.99 - 0.74 = 2.25$  minutes.
6. On chart 4; find, for  $B'_{kbha} = 2.25$  minutes,  $g'_{bha} = 17.6^\circ$ .



7. Find  $g_{h2a}$  (steps 8—12, below) by equation (10):

$$g_{h2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} \right] \quad (10)$$

8.  $x_{cha} = B_{Bha} - x_{bh} = 35 - 20 = 15$  minutes.  
 9.  $\frac{x_{cha}}{f_{2a}} = \frac{15}{120} = 0.125$ .  
 10.  $\text{Log } g'_{bha} = \log 17.6 = 1.245$ .  
 11.  $\text{Log } g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} = 1.245 - 0.125 = 1.12$ .  
 12.  $g_{h2a} = \log^{-1} \left( \log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} \right) = \log^{-1} 1.12 = 13.20^\circ$ .  
 13.  $\frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} = \frac{17.6}{13.2} = 1.332$ .

NOTE E: If  $g_{h2a}$  were found to be less than  $0.1^\circ$ , the solution from this point would be that of problem IX-B (steps 14—82); for equation (12) (step 17, problem IX-B) would be used to obtain value of  $F$  instead of equation (11) (step 17, below).

NOTE F: If  $g_{h2a}$  were found to be equal to or greater than  $g'_{bha}$ , that is, if  $\frac{g'_{bha}}{g_{h2a}}$  were equal to or less than unity, steps 14—32, below, would be replaced by steps 10—14, problem II-A, letting  $f_h = f_{h1a}$ .

14.  $\text{Log } \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} = \log 1.332 = 0.125$ .  
 15.  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} = \frac{27}{120} = 0.225$ .  
 16.  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} = 0.225 \times 0.125 = 0.0281$ .  
 17. Find  $F$  (steps 18—32, below) by equation (11):

$$F = \frac{f_{2a} Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} - \theta_a Y'_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) \quad (11)$$

18.  $(m+g)_a = RT - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$ .  
 19. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_a = 180^\circ$ ; find, for  $g_{h2a} = 13.2^\circ$ ,  $Y_{220\ h2a} = 0.000709$ ; and, for  $g'_{bha} = 17.6^\circ$ ,  $Y'_{220\ bha} = 0.00031$ .  
 20. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 250^\circ$  on scale B,  $Z_{h2a} (= Z'_{bha}) = 46.4$ .  
 21.  $Y_{h2a} = Z_{h2a} Y_{220\ h2a} = 46.4 \times 0.000709 = 0.03285$ .  
 22. On chart 6, on curve for  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_a = 180^\circ$ ; find, for  $g_{h2a} = 13.2^\circ$ ,  $\rho_{h2a} = 0.69$ .  
 23.  $\frac{Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} = \frac{0.03285}{0.69} = 0.0476$ .  
 24.  $\frac{f_{2a} Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} = 120 \times 0.0476 = 5.72$ .  
 25.  $Y'_{bha} = Z'_{bha} Y'_{220\ bha} = 46.4 \times 0.00031 = 0.0144$ .  
 26.  $f_{2a} - f_{h1a} = 120 - 27 = 93$  minutes.  
 27.  $Y'_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) = 0.0144 \times 93 = 1.339$ .

NOTE G: If  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}}$  (step 16) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_a$  may be taken as 1, and steps 28—30, below, may be omitted.

$$28. 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} = 10.0 \times 0.0281 = 0.281.$$

$$29. \text{Log}^{-1} \left( 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2a}} \right) = \text{log}^{-1} 0.281 = 1.91.$$

$$30. \theta_a = \frac{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g_{bha}}{g_{h2a}} \right]}{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g_{bha}}{g_{h2a}} \right] + \rho_{h2a} - 1} = \frac{1.91}{1.91 + 0.69 - 1} = \frac{1.91}{1.60} = 1.192.$$

$$31. \theta_a Y'_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) = 1.192 \times 1.339 = 1.598.$$

32. From steps 17, 24, and 31:

$$F = \frac{f_{2a} Y_{h2a}}{\rho_{h2a}} - \theta_a Y'_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) = 5.72 - 1.598 = 4.12 \text{ minutes.}$$

NOTE H: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the the thermal death time curve for which the given process (35 minutes when initial temperature is  $160^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with  $IT = 180^\circ$  to give an equivalent process. This part of the problem is analogous to problem VII-A.

$$33. I = RT - IT = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ.$$

$$34. jI = 1.08 \times 70^\circ = 75.6^\circ.$$

$$35. \text{On chart 4; find, for } jI = 75.6^\circ, B''_{kh} = 2.877 \text{ minutes.}$$

$$36. \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 0.74 \text{ minute. (See step 4.)}$$

$$37. B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 2.877 - 0.74 = 2.137 \text{ minutes.}$$

$$38. \text{On chart 4; find, for } B'_{kbh} = 2.137 \text{ minutes, } g'_{bh} = 13.6^\circ.$$

$$39. \text{On chart 2, on curve, } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT = 250^\circ \text{ on scale A, } F_i = 1.00 \text{ minute.}$$

$$40. U = FF_i = 4.12 \times 1.00 = 4.12 \text{ minutes.}$$

$$41. m + g = RT - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ.$$

$$42. \frac{f_{h1}}{U} = \frac{27}{4.12} = 6.55.$$

$$43. \text{On chart 3, on curve for } m + g = 180^\circ \text{ and } z = 18^\circ; \text{ find, for } \frac{f_{h1}}{U} = 6.55, g_e = 6.75.$$

$$44. \frac{g'_{bh}}{g_e} = \frac{13.6}{6.75} = 2.017.$$

NOTE I: If  $g'_{bh}$  were equal to or less than  $g_e$ , that is, if  $\frac{g'_{bh}}{g_e}$  were equal to or less than unity, it would show that the end of the process comes at or before the break in heating curve. The problem would then be solved from this point as a simple heating curve problem by steps 10—12, problem I-A, taking  $g = g_e$  from step 43, above.

$$45. \text{Log} \frac{g'_{bh}}{g_e} = \text{log} 2.017 = 0.304.$$

$$46. \frac{f_{h1}}{f_2} = 0.225. \text{ (See step 15.)}$$

$$47. \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_e} = 0.225 \times 0.304 = 0.0683.$$

48. Find  $V_h$  by equation (7):

$$V_h = 1 + \theta_\epsilon \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) \quad (7)$$

49. On chart 5, on curve representing  $z=18^\circ$  and  $m+g=180^\circ$ ; find, for  $g'_{bh}=13.6^\circ$ ,  $Y'_{220\ bh}=0.00065$ .
50. On chart 2, on curve  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT=250^\circ$  on scale B,  $Z'_{bh}=46.4$ .
51.  $Y'_{bh}=Z'_{bh}Y'_{220\ bh}=46.4 \times 0.00065=0.0302$ .
52.  $\frac{Y'_{bh}}{F} = \frac{0.0302}{4.12} = 0.0073$ .
53.  $f_2 - f_{h1} = 93$  minutes. (See step 26.)
54.  $\frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 0.0073 \times 93 = 0.679$ .

NOTE J: If  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon}$  (step 47) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_\epsilon$  may be taken as 1.0, and steps 55—58, below, may be omitted.

55. On chart 6, on curve representing  $z=18^\circ$  and  $m+g=180^\circ$ ; find, for  $g_\epsilon=6.75^\circ$ ,  $\rho_\epsilon=0.778$ .
56.  $10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} = 10 \times 0.0683 = 0.683$ .
57.  $\text{Log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} \right] = \text{log}^{-1} 0.0683 = 4.820$ .
58.  $\theta_\epsilon = \frac{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} \right]}{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} \right] + \rho_\epsilon - 1} = \frac{4.820}{4.820 + 0.778 - 1} = \frac{4.82}{4.60} = 1.05$ .
59.  $\theta_\epsilon \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 1.05 \times 0.679 = 0.713$ .
60.  $V_h = 1 + \theta_\epsilon \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 1 + 0.713 = 1.713$ .
61.  $f_{hh} = \frac{f_2}{V_h} = \frac{120}{1.713} = 70.1$ .
62.  $\frac{f_{hh}}{U} = \frac{70.1}{4.12} = 17.01$ .

NOTE K: On chart 3, it is seen that, when  $z=18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{hh}}{U}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  be found less than  $0.1^\circ$ , the method of problem VII-B (steps 30—42) should be followed from this point. Since  $g$  is greater than  $0.1^\circ$ , steps 63—67 below, are analogous to steps 31—35 of problem VII-A.

63. On chart 3, on curve for  $m+g=180^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f_{hh}}{U}=17.01$ ,  $g_{h2}=12.00^\circ$ .
64. Find  $x_{ch}$  by means of equation (7):

$$x_{ch} = f_2 \log \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} \quad (7)$$

$$65. \text{Log } \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} = \text{log } \frac{13.6}{12.0} = \text{log } 1.133 = 0.055.$$

$$66. x_{ch} = f_2 \text{log } \frac{g'_{bh}}{g_{h2}} = 120 \times 0.055 = 6.60 \text{ minutes.}$$

$$67. B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch} = 20.0 + 6.6 = 26.6 \text{ minutes} = \text{length of process.}$$

### PROBLEM IX-B

Simple process. Calculation of effect of change in initial temperature upon time necessary for sterilization when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ );
2. The time of occurrence of break is given [item (5) under Specifications]; and
3.  $(RT - CT_{Mh})$  is less than  $0.1^\circ$  (see notes E and K).

Specifications:

- (1) Product.....(W)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Retort temperature.....( $RT = 240^\circ$ )
- (5) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x_{bh} = 8$  minutes)
- (6) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 6$  minutes)
- (7) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 22.7$  minutes)
- (8) Initial temperature.....( $IT = 190^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (10)  $j = 1.41$ .
- (11) Process necessary for sterilization at another initial temperature.....  
.....( $B_{Bha} = 65$  minutes when  $IT_a = 160^\circ$ )

Find process,  $B_{Bh}$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $190^\circ$ .

NOTE A: If a value of  $z$  is not specified [item (3) under Specifications], one may be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (5) under Specifications], the method of solution of either problem IX-C, IX-D, or IX-E would be followed. The choice of method would depend upon whether or not one of the initial temperatures were higher than  $CT'_{bh}$ ; and if so, which one.

NOTE C: If the given process [item (11) under Specifications] were a divided process, the method of solution would be that of problem XXI.

Solution:

NOTE D: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—41). This is a repetition of steps 1—41 of problem VIII-B.

1.  $I_a = RT - IT_a = 240^\circ - 160^\circ = 80^\circ$ .
2.  $jI_a = 1.41 \times 80^\circ = 112.8^\circ$ .
3. On chart 4; find, for  $jI_a = 112.8^\circ$ ,  $B''_{kha} = 3.062$  minutes.



4.  $\frac{x'_{bha}}{f_{h1a}} = \frac{8}{6} = 1.33$  minutes.
5.  $B'_{kbha} = B''_{kha} - \frac{x'_{bha}}{f_{h1a}} = 3.06 - 1.33 = 1.73$  minutes.
6. On chart 4; find, for  $B'_{kbha} = 1.73$  minutes,  $g'_{bha} = 5.4^\circ$ .
7. Find  $g_{h2a}$  (steps 8—12, below) by equation (10):
 
$$g_{h2a} = \log^{-1} \left( \log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} \right) \quad (10)$$
8.  $x_{cha} = B_{Bha} - x'_{bha} = 65.0 - 8.0 = 57.0$  minutes.
9.  $\frac{x_{cha}}{f_{2a}} = \frac{57.0}{22.7} = 2.509$ .
10.  $\log g'_{bha} = \log 5.4 = 0.732$ .
11.  $\log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} = 0.732 - 2.509 = -1.777 = \bar{2}.223$ .
12.  $g_{h2a} = \log^{-1} \left( \log g'_{bha} - \frac{x_{cha}}{f_{2a}} \right) = \log^{-1} \bar{2}.223 = 0.0167^\circ$ .
13.  $\frac{g_{bha}}{g_{h2a}} = \frac{5.4}{0.0167} = 323.5$ .

NOTE E: It is noted that  $g_{h2a}$  is less than  $0.1^\circ$ . Thus, the symbol,  $g_{h2} < .1a$ , must be substituted for the symbol,  $g_{h2a}$ . If  $g_{h2a}$  were found to be greater than  $0.1^\circ$ , the solution from this point would be that of problem IX-A (steps 14—67); for equation (11) (steps 17, problem IX-A) would be used to obtain the value of  $F$  instead of equation (12) (step 17, below).

NOTE F: If  $g_{h2a}$  were found to be equal to or greater than  $g_{bha}$ , that is, if  $\frac{g_{bha}}{g_{h2a}}$  were equal to or less than unity, steps 14—41, below, would be replaced by steps 8—14, of problem II-B, letting  $f_h = f_{h1}$ .

14.  $\log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} = \log 323.5 = 2.51$ .
15.  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} = \frac{6.0}{22.7} = 0.264$ .
16.  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \cdot \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} = 0.264 \times 2.51 = 0.662$ .
17. Find  $F$  (steps 18—41, below) by equation (12):
 
$$F = f_{2a} \left[ \frac{Y_{h2} .1a}{\rho_{h2} .1a} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z}} \right] - \theta_{a < .1} Y_{bha} (f_{2a} - f_{h1a}) \quad (12)$$
18.  $(m+g)_a = RT - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ$ .
19. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ ; for  $g = 0.1^\circ$ , find  $Y_{220 \ h2} .1a = 0.0353$ .
20. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 240^\circ$  on scale B,  $Z_{h2} .1a = 12.9$ .
21.  $Y_{h2} .1a = Z_{h2} .1a Y_{220 \ h2} .1a = 12.9 \times 0.0353 = 0.4554$ .
22. On chart 6, interpolating for curve,  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_a = 170^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{h2} .1a = 0.946$ .
23.  $\frac{Y_{h2} .1a}{\rho_{h2} .1a} = \frac{0.455}{0.946} = 0.4805$ .
24. From steps 11 and 12;  $\log g_{h2} < .1a = \bar{2}.223 = -1.777$ .
25.  $1 + \log g_{h2} < .1a = 1 + (-1.777) = 1 - 1.777 = -0.777$ .

$$26. \quad 250^\circ - RT = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ.$$

$$27. \quad \frac{250^\circ - RT}{z} = \frac{10^\circ}{18^\circ} = 0.556.$$

$$28. \quad \text{Log}^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z} = \text{log}^{-1} 0.556 = 3.60.$$

$$29. \quad \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\text{log}^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z}} = \frac{-0.777}{3.60} = -0.216.$$

$$30. \quad \frac{Y_{h2 .1a}}{\rho_{h2 .1a}} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\text{log}^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z}} = 0.4805 - (-0.216) = 0.4805 + 0.216 = 0.696.$$

$$31. \quad f_2 \left[ \frac{Y_{h2 .1a}}{\rho_{h2 .1a}} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\text{log}^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z}} \right] = 22.7 \times 0.696 = 15.799 \text{ minutes.}$$

$$32. \quad \text{On chart 5, on curve, } z = 18^\circ; \text{ find, for } g'_{bha} = 5.4^\circ, Y'_{220 bha} = 0.00358.$$

$$33. \quad \text{On chart 2, on curve, } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT = 240^\circ \text{ on scale B, } Z'_{bha} = 12.9. \\ (\text{See step 20.})$$

$$34. \quad Y'_{bha} = Z'_{bha} Y'_{220 bha} = 12.9 \times 0.00358 = 0.0461.$$

$$35. \quad f_{2a} - f_{h1a} = 22.7 - 6.0 = 16.7 \text{ minutes.}$$

$$36. \quad Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h1a}) = 0.0461 \times 16.7 = 0.770.$$

NOTE G: If  $\frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a}$  (step 16) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_a$  may be taken as 1.0, and steps 37—39, below, may be omitted. They are included here merely to give the method.

$$37. \quad 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} = 10.0 \times 0.662 = 6.62.$$

$$38. \quad \text{Log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} \right] = \text{log}^{-1} 6.62 = 4,596,000.$$

$$39. \quad \theta_a < .1 = \frac{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} \right]}{\text{log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1a}}{f_{2a}} \log \frac{g'_{bha}}{g_{h2} < .1a} \right] + \rho_{h2 .1a} - 1} = \frac{4,596,000}{4,596,000 + 0.946 - 1} \\ = \frac{4,596,000}{4,595,999.946} = 1.0.$$

$$40. \quad \theta_a < .1 Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h1a}) = 1.0 \times 0.77 = 0.770.$$

$$41. \quad \text{From steps 17, 31, and 40:}$$

$$F = f_{2a} \left[ \frac{Y_{h2 .1a}}{\rho_{h2 .1a}} - \frac{1 + \log g_{h2} < .1a}{\text{log}^{-1} \frac{250^\circ - RT}{z}} \right] - \theta_a < .1 Y'_{bha}(f_{2a} - f_{h1a}). \\ = 15.799 - 0.770 = 15.029 \text{ minutes.}$$

NOTE H: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (65 minutes when initial temperature is  $160^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with  $IT = 190^\circ$  to give an equivalent process. This part of the problem is analogous to problem VII-B.

42.  $I = RT - IT = 240^\circ - 190^\circ = 50^\circ$ .
43.  $jI = 1.41 \times 50^\circ = 70.5^\circ$ .
44. On chart 4; find, for  $jI = 70.5^\circ$ ,  $B''_k = 2.848$  minutes.
45.  $\frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 1.33$  minutes. (See step 4.)
46.  $B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 2.848 - 1.33 = 1.518$  minutes.
47. On chart 4; find, for  $B'_{kbh} = 1.518$  minutes,  $g'_{bh} = 3.3^\circ$ .
48. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 240^\circ$  on scale A,  $F_i = 3.61$  minutes.
49.  $U = FF_i = 15.029 \times 3.61 = 54.25$  minutes.
50.  $m + g = RT - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ$ .
51.  $\frac{f_{h1}}{U} = \frac{6.0}{54.25} = 0.1105$ .

NOTE I: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{h1}}{U}$  below approximately 0.575 give a value of  $g_\epsilon$  which is less than  $0.1^\circ$ . Thus,  $g_\epsilon$  is less than  $g'_{bh}$ . If  $g_\epsilon$  were equal to or greater than  $g'_{bh}$ , it would show that the end of the process comes at or before the break in heating curve. The problem would then be a simple heating curve problem; and, taking  $g = g_\epsilon$ , the solution would be completed by steps 10—12, problem I-A.

52.  $\frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} = \frac{3.3}{\text{less than } 0.1} = \text{greater than } 33.0$ .
53.  $\text{Log } \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} = \log 33.0 = 1.518$ .
54.  $\frac{f_{h1}}{f_2} = 0.264$ . (See step 15.)
55.  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_\epsilon} = 0.264 = 1.518 = 0.401$ .
56. Find  $V_h$  by equation (7):
 
$$V_h = 1 + \theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) \quad (7)$$
57. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g'_{bh} = 3.3^\circ$ ,  $Y'_{220\ bh} = 0.00613$ .
58. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 240^\circ$  on scale B,  $Z'_{bh} = 12.9$ .
59.  $Y'_{bh} = Z'_{bh} Y'_{220\ bh} = 12.9 \times 0.00613 = 0.081$ .
60.  $\frac{Y'_{bh}}{F} = \frac{0.081}{15.03} = 0.00539$ .
61.  $f_2 - f_{h1} = 16.7$  minutes. (See step 35.)
62.  $\frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 0.00539 \times 16.7 = 0.0900$ .

NOTE J: If  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}}$  (step 55) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_{\epsilon < .1}$  may be taken as 1.0, and steps 63—66, below, may be omitted. They are included here merely to give the method.

63. On chart 6, interpolating for curve, representing  $z = 18^\circ$  and  $m + g = 170^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{\epsilon < .1} (= \rho_{h2\ .1}) = 0.946$ .
64.  $10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} = 10 \times 0.401 = 4.01$ .

$$65. \log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right] = \log^{-1} 4.01 = 10,233.$$

$$66. \theta_{\epsilon < .1} = \frac{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right]}{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g_{\epsilon < .1}} \right] + \rho_{\epsilon < .1} - 1} = \frac{10,233}{10,233 + 0.946 - 1} \\ = \frac{10,233}{10,232.946} = 1.000.$$

$$67. \theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 1.00 \times 0.09 = 0.09.$$

$$68. V_h = 1 + \theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 1 + 0.09 = 1.09.$$

$$69. f_{hh} = \frac{f_2}{V_h} = \frac{22.7}{1.09} = 20.82.$$

$$70. \frac{f_{hh}}{U} = \frac{20.82}{54.25} = 0.384.$$

NOTE K: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f_{hh}}{U}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . The value of  $g_{h2 < .1}$  therefore, cannot be taken from the curves of chart 3. If  $g$  were greater than  $0.1^\circ$ , we should continue from this point by method of problem IX-A, steps 63—67. Steps 71—83, below, are analogous to steps 30—42 of problem VII-B.

71. Find  $x_{ch < .1}$  by equation (9):

$$x_{ch < .1} = U \left[ 1 + \frac{\theta_{\epsilon < .1} Y'_{bh} (f_2 - f_{h1})}{F} - \frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F \rho_{h2 .1}} \right] + f_2 (1 + \log g'_{bh}) \quad (9)$$

72. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $Y_{220 \ h2 .1} = 0.0353$ .

73. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 240^\circ$  on scale B,  $Z_{h2 .1} = 12.9$ .

74.  $Y_{h2 .1} = Z_{h2 .1} Y_{220 \ h2 .1} = 12.9 \times 0.0353 = 0.4554$ .

$$75. \frac{f_2}{F} = \frac{22.7}{15.03} = 1.509.$$

$$76. \frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F} = 1.509 \times 0.455 = 0.687.$$

$$77. \frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F \rho_{h2 .1}} = \frac{0.687}{0.946} = 0.726.$$

78. From step 49,  $U = 54.25$  minutes; from step 67,

$$\theta_{\epsilon < .1} \frac{Y'_{bh}}{F} (f_2 - f_{h1}) = 0.09; \text{ and from step 77, } \frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F \rho_{h2 .1}} = 0.726.$$

$$\therefore U \left[ 1 + \frac{\theta_{\epsilon < .1} Y'_{bh} (f_2 - f_{h1})}{F} - \frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F \rho_{h2 .1}} \right] = 54.25 \{ 1 + 0.09 - 0.726 \} \\ = 54.25 \times 0.364 = 19.74 \text{ minutes.}$$

79. Taking  $g'_{bh}$  from step 47,  $\log g'_{bh} = \log 3.3 = 0.519$ .

80.  $1 + \log g'_{bh} = 1.0 + 0.519 = 1.519$ .

81.  $f_2 (1 + \log g'_{bh}) = 22.7 \times 1.519 = 34.48$  minutes.

82. From steps 71, 78, and 81:

$$x_{ch < .1} = U \left[ 1 + \frac{\theta_{\epsilon < .1} Y'_{bh} (f_2 - f_{h1})}{F} - \frac{f_2 Y_{h2 .1}}{F \rho_{h2 .1}} \right] + f_2 (1 + \log g'_{bh}) \\ = 19.7 + 34.5 = 54.2 \text{ minutes.}$$

83.  $B_{Bh} = x'_{bh} + x_{ch < .1} = 8.0 + 54.2 = 62.2$  minutes = length of process. (See curves IX-B, chart 7, sections B and B'.)



## PROBLEM IX-C

Simple process. Calculation of effect of change in initial temperature upon time necessary for sterilization when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ );
2. The temperature at center of can when break occurs is given [item (4) under Specifications];
3. The temperature at center of can when break occurs is higher than either initial temperature ( $CT'_{bh}$  is higher than  $IT$  and  $IT_a$ ).
4.  $(RT - CT_{Mh})$  has any value.

Specifications:

- (1) Product.....(X)
- (2) Size of can.....(No. 5)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 260^\circ$ )
- (4) Temperature at center of can at time of break in heating curve.....( $CT'_{bh} = 250^\circ$ )
- (5) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 15$  minutes)
- (6) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 10$  minutes)
- (7) Initial temperature.....( $IT = 200^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .
- (9) Process necessary for sterilization at another initial temperature.....( $B_{Bha} = 42$  minutes when  $IT_a = 165^\circ$ )

Find process,  $B_{Bh}$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $200^\circ$ .

NOTE A: If value of  $x'_{bh}$  were given instead of that of  $CT'_{bh}$  [item (4) under Specifications], the method of solution of either problem IX-A or IX-B would be followed. The choice of method between the two would depend upon whether  $RT - CT_{Mh}$  is greater than or less than  $0.1^\circ$ .

Solution:

1.  $I = RT - IT = 260^\circ - 200^\circ = 60^\circ$ .
2.  $I_a = RT - IT_a = 260^\circ - 165^\circ = 95^\circ$ .
3. On chart 4; find, for  $I_a = 95^\circ$ ,  $B''_{koha} = 2.978$  minutes; and, for  $I = 60^\circ$ ,  $B''_{koh} = 2.778$  minutes.
4.  $B''_{koh} - B''_{koha} = 2.778 - 2.978 = -0.200$  minute.
5.  $f_{h1}(B''_{koh} - B''_{koha}) = 15 \times (-0.2) = -3.0$  minutes, which must be added to the process.
6.  $B_{Bh} = B_{Bha} - f_{h1}(B''_{koh} - B''_{koha}) = 42.0 + (-3.0) = 42.0 - 3.0 = 39.0$  minutes = length of process. (See curves IX-C, chart 7, sections B and B').

PROBLEM IX-D

Simple process. Calculation of effect of change in initial temperature upon time necessary for sterilization when

- 1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ );
- 2. The temperature at center of can when break occurs is given [item (4) under Specifications];
- 3. The temperature at center of can when break occurs is lower than the initial temperature of can in process to be calculated ( $CT'_{bh}$  is lower than  $IT$ ); and
- 4.  $(RT - CT_{Mh})$  has any value.

Specifications:

- (1) Product.....( $W$ )
- (2) Size of can.....(No. 5)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 250^\circ$ )
- (4) Temperature at center of can at time of break in heating curve.....( $CT_{bh} = 192^\circ$ )
- (5) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 21$  minutes)
- (6) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 38$  minutes)
- (7) Initial temperature.....( $IT = 200^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .
- (9) Process necessary for sterilization at another initial temperature.....( $B_{Bha} = 56$  minutes when  $IT_a = 160^\circ$ )

Find process,  $B_{Bh}$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $200^\circ$ .

Solution:

- 1.  $g'_{bh} = RT - CT'_{bh} = 250^\circ - 192^\circ = 58^\circ$ .
- 2.  $I_a = RT - IT_a = 250^\circ - 160^\circ = 90^\circ$ .
- 3.  $jI_a = 1.41 \times 90^\circ = 126.9^\circ$ .
- 4.  $I = RT - IT = 250^\circ - 200^\circ = 50^\circ$ .
- 5.  $jI = 1.41 \times 50^\circ = 70.5^\circ$ .
- 6. On chart 4; find, for  $g'_{bh} = 58^\circ$ ,  $B'_{kbh} = 2.765$  minutes; for  $jI_a = 126.9^\circ$ ,  $B''_{kha} = 3.103$  minutes; and, for  $jI = 70.5^\circ$ ,  $B''_{kh} = 2.848$  minutes.
- 7.  $B'_{kbh} - B''_{kha} = 2.765 - 3.103 = -0.338$  minute.
- 8.  $f_{h1}(B'_{kbh} - B''_{kha}) = 21 \times (-0.338) = -7.098$  minutes.
- 9.  $B''_{kh} - B'_{kbh} = 2.848 - 2.765 = 0.083$  minute.
- 10.  $f_2(B''_{kh} - B'_{kbh}) = 38 \times 0.083 = 3.154$  minutes.
- 11.  $f_{h1}(B'_{kbh} - B''_{kha}) + f_2(B''_{kh} - B'_{kbh}) = -7.098 + 3.154 = -3.944$  minutes.
- 12.  $B_{Bh} = B_{Bha} + [f_{h1}(B'_{kbh} - B''_{kha}) + f_2(B''_{kh} - B'_{kbh})] = 56.0 + (-3.9) = 56.0 - 3.9 = 52.1$  minutes = length of process. (See curves IX-D, chart 7, sections A and A'.)

## PROBLEM IX-E

Simple process. Calculation of effect of change in initial temperature upon time necessary for sterilization when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ );
2. The temperature at center of can when break occurs is given [item (4) under Specifications];
3. The temperature at center of can when break occurs is lower than the initial temperature of can in the given process ( $CT'_{bh}$  is lower than  $IT_a$ ); and
4.  $(RT - CT_{Mh})$  has any value.

Specifications:

- (1) Product.....(W)
- (2) Size of can.....(No. 5)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 255^\circ$ )
- (4) Temperature at center of can at time of break in heating curve.....( $CT'_{bh} = 192^\circ$ )
- (5) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 21$  minutes)
- (6) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 38$  minutes)
- (7) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .
- (9) Process necessary for sterilization at another initial temperature.....( $B_{Bha} = 45$  minutes when  $IT_a = 200^\circ$ )

Find process,  $B_{Bh}$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $160^\circ$ .

Solution:

1.  $g'_{bh} = RT - CT'_{bh} = 255^\circ - 192^\circ = 63^\circ$ .
2.  $I_a = RT - IT_a = 255^\circ - 200^\circ = 55^\circ$ .
3.  $jI_a = 1.41 \times 55^\circ = 77.6^\circ$ .
4.  $I = RT - IT = 255^\circ - 160^\circ = 95^\circ$ .
5.  $jI = 1.41 \times 95^\circ = 134^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $g'_{bh} = 63^\circ$ ,  $B'_{kbh} = 2.800$  minutes; for  $jI_a = 77.6^\circ$ ,  $B''_{kha} = 2.890$  minutes; and, for  $jI = 134^\circ$ ,  $B''_{kh} = 3.126$  minutes.
7.  $B'_{kbh} - B''_{kha} = 2.800 - 2.890 = -0.090$  minute.
8.  $f_2(B'_{kbh} - B''_{kha}) = 38 \times (-0.090) = -3.42$  minutes.
9.  $B''_{kh} - B'_{kbh} = 3.126 - 2.800 = 0.326$  minute.
10.  $f_{h1}(B''_{kh} - B'_{kbh}) = 21 \times 0.326 = 6.85$  minutes.
11.  $f_2(B'_{kbh} - B''_{kha}) + f_{h1}(B''_{kh} - B'_{kbh}) = -3.42 + 6.85 = 3.43$  minutes.
12.  $B_{Bh} = B_{Bha} + [f_2(B'_{kbh} - B_{kha}) + f_{h1}(B''_{kh} - B'_{kbh})] = 45.0 + 3.4 = 48.4$  minutes = length of process. (See curves IX-E, chart 7, sections A and A'.)

PROBLEM X-A

Simple process. Calculation of temperature attained in center of can in a given length of time when

- 1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ );
- 2. The time of occurrence of break is given [item (4) under Specifications]; and
- 3.  $(RT - CT'_{h2})$  has any value.

Specifications:

- (1) Product.....(W)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 245^\circ$ )
- (4) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 8$  minutes)
- (5) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 6$  minutes)
- (6) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 22.7$  minutes)
- (7) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .

Find the temperature at center of can:

- ( $CT'_{h1}$ )—3 minutes ( $x'_{h1}$ ) after the beginning of the process, and
- ( $CT'_{h2}$ )—10 minutes ( $x'_{h2}$ ) after the beginning of the process.

NOTE A: If value of  $CT'_{bh}$  be given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (4) under Specifications], the method of solution of problem X-B should be followed.

Solutions:

- 1.  $I = RT - IT = 245^\circ - 160^\circ = 85^\circ$ .
- 2.  $jI = 1.41 = 85^\circ = 119.8^\circ$ .
- 3. On chart 4; find, for  $jI = 119.8^\circ$ ,  $B''_{kh} = 3.077$  minutes.
- 4.  $\frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = \frac{8}{6} = 1.33$  minutes.
- 5.  $B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 3.08 - 1.33 = 1.75$  minutes.
- 6. On chart 4; find, for  $B'_{kbh} = 1.75$  minutes,  $g'_{bh} = 5.65^\circ$ .
- 7.  $CT'_{bh} = RT - g'_{bh} = 245^\circ - 5.65^\circ = 239.35^\circ$ .

NOTE B: Since  $x'_{h1}$  (3 minutes) is less than  $x'_{bh}$  (8 minutes), the first point to be determined ( $CT'_{h1}$ ) falls before the break in heating curve; and since  $x'_{h2}$  (10 minutes) is greater than  $x'_{bh}$ , the second point ( $CT'_{h2}$ ) falls after the break.

$CT'_{h1}$ :

- 8.  $\frac{x'_{h1}}{f_{h1}} = \frac{3}{6} = 0.50$ .
- 9.  $B'_{kh1} = B''_{kh} - \frac{x'_{h1}}{f_{h1}} = 3.08 - 0.50 = 2.58$  minutes.
- 10. On chart 4; find, for  $B'_{kh1} = 2.58$  minutes,  $g'_{h1} = 38.00^\circ$ .

11.  $CT'_{h1} = RT - g'_{h1} = 245.00^\circ - 38.00^\circ = 207.00^\circ =$  temperature of can at 3 minutes. (See curves X-A ( $CT'_{h1}$ ), chart 7, sections A and A'.)



$CT'_{h2}$ :

$$12. \quad x'_{h2} - x'_{bh} = 10 - 8 = 2 \text{ minutes.}$$

$$13. \quad \frac{x'_{h2} - x'_{bh}}{f_2} = \frac{2.0}{22.7} = 0.088 \text{ minute.}$$

$$14. \quad B'_{kh2} = B'_{kbh} = \frac{x'_{h2} - x'_{bh}}{f_2} = 1.75 - 0.09 = 1.66 \text{ minutes.}$$

NOTE C: If  $B'_{kh2}$  were found to be negative, it would show that  $RT - CT'_{h2}$  is less than  $0.1^\circ$ ; so that (within one-tenth of a degree)  $CT'_{h2} = RT = 245^\circ$ .

$$15. \quad \text{On chart 4; find, for } B'_{kh2} = 1.66 \text{ minutes, } g'_{h2} = 4.6^\circ.$$

$$16. \quad CT'_{h2} = RT - g'_{h2} = 245.0^\circ - 4.6^\circ = 241.4^\circ = \text{temperature of can at 10 minutes.}$$

(See curves X-A ( $CT_{h2}$ ), chart 7, sections A and A'.)

### PROBLEM X-B

Simple process. Calculation of temperature attained in center of can in a given length of time when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ );
2. The temperature at center of can when break occurs is given [item (4) under Specifications]; and
3.  $(RT - CT'_{h2})$  has any value.

Specifications:

- (1) Product.....(W)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 245^\circ$ )
- (4) Temperature at center of can at time of break in heating curve.....  
.....( $CT'_{bh} = 239.35^\circ$ )
- (5) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 6$  minutes)
- (6) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 22.7$  minutes)
- (7) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .

Find the temperature at center of can: .

- ( $CT'_{h1}$ )— 5 minutes ( $x'_{h1}$ ) after the beginning of the process, and  
( $CT'_{h2}$ )—45 minutes ( $x'_{h2}$ ) after the beginning of the process.

NOTE A: If value of  $x'_{bh}$  were given instead of that of  $CT'_{bh}$  [item (4) under Specifications], the methods of solution of problem X-A would be followed.

Solutions:

1.  $I = RT - IT = 245^\circ - 160^\circ = 85^\circ$ .
2.  $jI = 1.41 \times 85^\circ = 119.8^\circ$ .
3.  $g'_{bh} = RT - CT'_{bh} = 245^\circ - 239.35^\circ = 5.65^\circ$ .
4. On chart 4; find, for  $jI = 119.8^\circ$ ,  $B''_{kh} = 3.077$  minutes; and, for  $g'_{bh} = 5.65^\circ$ ,  
 $B'_{kbh} = 1.75$  minutes.
5.  $\frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = B''_{kh} - B'_{kbh} = 3.08 - 1.75 = 1.33$  minutes.

6.  $x'_{bh} = \frac{f_{h1}x'_{bh}}{f_{h1}} = 6 \times 1.33 = 8$  minutes.

NOTE B: Since  $x'_{h1}$  (5 minutes) is less than  $x'_{bh}$  (8 minutes), the first point to be determined ( $CT'_{h1}$ ) falls before the break in heating curve; and, since  $x'_{h2}$  (45 minutes) is greater than  $x'_{bh}$ , the second point ( $CT'_{h2}$ ) falls after the break.

$CT'_{h1}$ :

7.  $\frac{x'_{h1}}{f_{h1}} = \frac{5}{6} = 0.833$ .

8.  $B'_{kh1} = B''_{kh} - \frac{x'_{h1}}{f_{h1}} = 3.08 - 0.83 = 2.25$  minutes.

9. On chart 4; find, for  $B'_{kh1} = 2.25$  minutes,  $g'_{h1} = 17.7^\circ$ .

10.  $CT'_{h1} = RT - g'_{h1} = 245.0^\circ - 17.7^\circ = 227.3^\circ =$  temperature of can at 5 minutes.  
(See curves X-B ( $CT'_{h1}$ ), chart 7, sections A and A'.)

$CT'_{h2}$ :

11.  $x'_{h2} - x'_{bh} = 45 - 8 = 37$  minutes.

12.  $\frac{x'_{h2} - x'_{bh}}{f_2} = \frac{37.0}{22.7} = 1.63$  minutes.

13.  $B'_{kh2} = B'_{kbh} - \frac{x'_{h2} - x'_{bh}}{f_2} = 1.75 - 1.63 = 0.11$  minute.

NOTE C: If  $B'_{kh2}$  were found to be negative, it would show that  $RT - CT'_{h2}$  is less than  $0.1^\circ$ ; so that (within one-tenth of a degree)  $CT'_{h2} = RT = 245^\circ$ .

14. On chart 4; find, for  $B'_{kh2} = 0.11$  minute,  $g'_{h2} = 0.13^\circ$ .

15.  $CT'_{h2} = RT - g'_{h2} = 245.00^\circ - 0.13^\circ = 244.87^\circ =$  temperature of can at 45 minutes. (See curves X-B ( $CT'_{h2}$ ), chart 7, sections A and A'.)

PROBLEM XI-A

Simple process. Calculation of time necessary to reach a given temperature at center of can when

- 1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ );
- 2. The time of occurrence of break is given [item (4) under Specifications]; and
- 3.  $(RT - CT'_{h2})$  has any value.

Specifications:

- (1) Product.....(X)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Retort temperature.....( $RT = 260^\circ$ )
- (4) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 17.87$  minutes)
- (5) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 15$  minutes)
- (6) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 10$  minutes)
- (7) Initial temperature.....( $IT = 150^\circ$ )
- (8)  $j = 1.41$ .

Find time necessary to reach

$(x'_{h1})$ — $243^\circ$  ( $CT'_{h1}$ ) at center of can, and

$(x'_{h2})$ — $253^\circ$  ( $CT'_{h2}$ ) at center of can.

NOTE A: If value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (4) under Specifications], the methods of solution of problem XI-B would be followed.

Solutions:

1.  $I = RT - IT = 260^\circ - 150^\circ = 110^\circ$ .
2.  $jI = 1.41 \times 110^\circ = 155.1^\circ$ .
3. On chart 4; find, for  $jI = 155.1^\circ$ ,  $B''_{kh} = 3.191$  minutes.
4.  $\frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = \frac{17.87}{15.00} = 1.191$  minutes.
5.  $B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 3.191 - 1.191 = 2.000$  minutes.
6. On chart 4; find, for  $B'_{kbh} = 2.000$  minutes,  $g'_{bh} = 10.0^\circ$ .
7.  $CT'_{bh} = RT - g'_{bh} = 260.0^\circ - 10.0^\circ = 250^\circ$ .

NOTE B: Since  $CT'_{h1}$  ( $243^\circ$ ) is less than  $CT'_{bh}$  ( $250^\circ$ ), the first point to be determined ( $x'_{h1}$ ) falls before the break in heating curve; and, since  $CT'_{h2}$  ( $253^\circ$ ) is greater than  $CT'_{bh}$ , the second point ( $x'_{h2}$ ) falls after the break.

$x'_{h1}$ :

8.  $g'_{h1} = RT - CT'_{h1} = 260^\circ - 243^\circ = 17^\circ$ .
9. On chart 4; find, for  $g'_{h1} = 17.0^\circ$ ,  $B'_{kh1} = 2.230$  minutes.
10.  $\frac{x'_{h1}}{f_{h1}} = B''_{kh} - B'_{kh1} = 3.191 - 2.230 = 0.961$  minute.
11.  $x'_{h1} = f_{h1} \frac{x'_{h1}}{f_{h1}} = 15 \times 0.961 = 14.4$  minutes = time necessary to reach  $243^\circ$ . (See curves XI-A ( $x'_{h1}$ ), chart 7, sections A and A'.)

$x'_{h2}$ :

12.  $g'_{h2} = RT - CT'_{h2} = 260^\circ - 253^\circ = 7^\circ$ .
13. On chart 4; find, for  $g'_{h2} = 7.0^\circ$ ,  $B'_{kh2} = 1.842$  minutes.
14.  $B'_{kbh} - B'_{kh2} = 2.000 - 1.842 = 0.158$  minute.
15.  $f_2(B'_{kbh} - B'_{kh2}) = 10 \times 0.158 = 1.58$  minutes.
16.  $x'_{h2} = x'_{bh} + f_2(B'_{kbh} - B'_{kh2}) = 17.9 + 1.6 = 19.5$  minutes = time necessary to reach  $253^\circ$ . (See curves XI-A ( $x_{h2}$ ) chart 7, sections A and A'.)

#### PROBLEM XI-B

Simple process. Calculation of time necessary to reach a given temperature at center of can when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ );
2. The temperature at center of can when break occurs is given [item (4) under Specifications]; and
3.  $(RT - CT'_{h2})$  has any value.

## Specifications:

- (1) Product.....(X)
- (2) Size of can.....(No. 5)
- (3) Retort temperature.....( $RT=260^\circ$ )
- (4) Temperature at center of can at time of break in heating curve.....( $CT'_{bh}=250^\circ$ )
- (5) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1}=15$  minutes)
- (6) Slope of heating curve after break.....( $f_2=10$  minutes)
- (7) Initial temperature.....( $IT=150^\circ$ )
- (8)  $j=1.41$ .

Find time necessary to reach

$(x'_{h1})—200^\circ$  ( $CT'_{h1}$ ) at center of can, and

$(x'_{h2})—259.5^\circ$  ( $CT'_{h2}$ ) at center of can.

NOTE A: If value of  $x'_{bh}$  were given instead of that of  $CT'_{bh}$  [item (4) under Specifications], the methods of solution of problem XI-A would be followed.

## Solutions:

1.  $I = RT - IT = 260^\circ - 150^\circ = 110^\circ$ .
2.  $jI = 1.41 \times 110^\circ = 155.1^\circ$ .
3.  $g'_{bh} = RT - CT'_{bh} = 260^\circ - 250^\circ = 10^\circ$ .
4. On chart 4; find, for  $jI = 155.1^\circ$ ,  $B'_{kh} = 3.191$  minutes; and, for  $g'_{bh} = 10.0^\circ$ ,  $B'_{kbh} = 2.000$  minutes.
5.  $\frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = B'_{kh} - B'_{kbh} = 3.191 - 2.000 = 1.191$  minutes.
6.  $x'_{bh} = f_{h1} \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 15 \times 1.191 = 17.87$  minutes.

NOTE B: Since  $CT'_{h1}$  ( $200^\circ$ ) is less than  $CT'_{bh}$  ( $250^\circ$ ), the first point to be determined ( $x'_{h1}$ ) falls before the break in heating curve; and, since  $CT'_{h2}$  ( $259.5^\circ$ ) is greater than  $CT'_{bh}$ , the second point ( $x'_{h2}$ ) falls after the break.

$x'_{h1}$ :

7.  $g'_{h1} = RT - CT'_{h1} = 260^\circ - 200^\circ = 60^\circ$ .
8. On chart 4; find, for  $g'_{h1} = 60.0^\circ$ ,  $B'_{kh1} = 2.776$  minutes.
9.  $\frac{x'_{h1}}{f_{h1}} = B'_{kh} - B'_{kh1} = 3.191 - 2.776 = 0.415$  minute.
10.  $x'_{h1} = f_{h1} \frac{x'_{h1}}{f_{h1}} = 15 \times 0.415 = 6.2$  minutes = time necessary to reach  $200^\circ$ . (See curves XI-B ( $x'_{h1}$ ), chart 7, sections A and A'.)

$x'_{h2}$ :

11.  $g'_{h2} = RT - CT'_{h2} = 260.0^\circ - 259.5^\circ = 0.5^\circ$ .
12. On chart 4; find, for  $g'_{h2} = 0.5^\circ$ ,  $B'_{kh2} = 0.700$  minute.
13.  $B'_{kbh} - B'_{kh2} = 2.000 - 0.700 = 1.300$  minutes.
14.  $f_2(B'_{kbh} - B'_{kh2}) = 10 \times 1.30 = 13.0$  minutes.
15.  $x'_{h2} = x'_{bh} + f_2(B'_{kbh} - B'_{kh2}) = 17.9 + 13.0 = 30.9$  minutes = time necessary to reach  $259.5^\circ$ . (See curves XI-B ( $x'_{h2}$ ), chart 7, sections A and A'.)



## PROBLEM XII-A

Simple process. Calculation of the amount of lethal heat at center of can up to a given time, expressed as percentage of heat necessary to sterilize; when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ); and
2.  $(RT - CT'_{h2})$  is greater than  $0.1^\circ$  (see note F).

Specifications:

- (1) Product.....(W)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$  ( $F = 15$  minutes)
- (5) Retort temperature.....( $RT = 260^\circ$ )
- (6) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 8$  minutes)  
[The value of  $CT'_{bh}$  may be specified instead of  $x'_{bh}$  (see notes A and C)]
- (7) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 6$  minutes)
- (8) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 22.7$  minutes)
- (9) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (10)  $j = 1.41$ .

Find percentage ( $\rho'_{ch2}$ ) of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to 48 ( $x'_{h2}$ ) minutes after beginning of process.

NOTE A: If value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (6) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note C.

NOTE B: Instead of  $x'_{h2}$ , the value of  $CT'_{h2}$  (temperature at center of can  $x'_{h2}$  minutes after beginning of process) may be specified. If  $CT'_{h2}$  were specified, the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note E.

Solution:

1.  $I = RT - IT = 260^\circ - 160^\circ = 100^\circ$ .
2.  $jI = 1.41 \times 100^\circ = 141.0^\circ$ .

NOTE C: Steps 3—7, below, are in accordance with solution of problem X-A (steps 3—7). If value of  $CT'_{bh}$  were given as a condition of the problem instead of  $x'_{bh}$  [item (6) of Specifications]; steps 3—7, below, would be replaced by steps 3—6 from solution of problem X-B.

3. On chart 4; find, for  $jI = 141.0^\circ$ ,  $B''_{kh} = 3.148$  minutes.

4.  $\frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = \frac{8}{6} = 1.333$  minutes.

5.  $B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 3.148 - 1.333 = 1.815$  minutes.

6. On chart 4; find, for  $B'_{khh} = 1.815$  minutes,  $g_{bh} = 6.54^\circ$ .

7.  $CT'_{bh} = RT - g'_{bh} = 260^\circ - 6.54 = 253.46^\circ$ .

NOTE D: Since  $x'_{h2}$  (48 minutes) is greater than  $x'_{bh}$  (8 minutes), the point to be determined falls after the break in heating curve. Thus, steps 8—12, below, are analogous to steps 12—16 of solution of problem X-A. If point to be determined fell before break in heating curve, steps 8—11 of solution of problem X-A would be followed. In latter case, symbol,  $x'_{h1}$ , should be used instead of  $x'_{h2}$ .

NOTE E: If value of  $CT'_{h2}$  were given as a condition of the problem instead of  $x'_{h2}$ , steps 8—12, below, would be replaced by the simple step:

$$7a. g'_{h2} = RT - CT'_{h2} = 260^\circ - CT'_{h2}$$

8.  $x'_{h2} - x'_{bh} = 48 - 8 = 40$  minutes.

9.  $\frac{x'_{h2} - x'_{bh}}{f_2} = \frac{40.0}{22.7} = 1.761$  minutes.

10.  $B'_{kh2} = B'_{khh} - \frac{x'_{h2} - x'_{bh}}{f_2} = 1.815 - 1.761 = 0.054$ .

NOTE F: If  $B'_{kh2}$  were found to be negative, it would show that  $RT - CT'_{h2}$  is less than  $0.1^\circ$ ; in which case, the solution from this point would follow that of problem XII-B (steps 11—27).

11. On chart 4; find, for  $B'_{kh2} = 0.054$  minute,  $g'_{h2} = 0.112^\circ$ .

12.  $CT'_{h2} = RT - g'_{h2} = 260.00^\circ - 0.11^\circ = 259.89^\circ =$  temperature of can at 48 minutes.

13. Use equation (12):

$$P'_{ch2} = 100A'_{ch2} = 100 \frac{f_{h1}Y'_{bh} + f_2(Y_{h2} - Y'_{bh})}{F} \quad (13)$$

NOTE G: If point to be determined fell before break in heating curve, this problem would be same as a simple heating curve problem; the symbol,  $g'$ , would be used instead of  $g'_{h2}$ ; and, since we should have the condition,  $f_{h1} = f_2$ , equation (13) would assume the form of equation (3) if  $RT - CT'$  were greater than  $0.1$ ; and the solution from this point would follow that of problem VI-A (steps 10—16°). If  $RT - CT'$  were less than  $0.1^\circ$ , equation (5) would be used, as in the solution of problem VI-B (steps 9—20).

14.  $m + g = RT - CW = 260^\circ - 70^\circ = 190^\circ$ .

15. On chart 5, on curve representing  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g'_{bh} = 6.54^\circ$ ,  $Y'_{220bh} = 0.00272$ ; and, for  $g'_{h2} = 0.112^\circ$ ,  $Y_{220h2} = 0.0342$ .

16. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT = 260^\circ$  on scale B,  $Z'_{bh} (= Z_{h2}) = 166.0$ .

17.  $Y'_{bh} = Z'_{bh} Y'_{220bh} = 166.0 \times 0.00272 = 0.451$ .

18.  $Y_{h2} = Z_{h2} Y_{220h2} = 166.0 \times 0.0342 = 5.677$ .

19.  $f_{h1}Y'_{bh} = 6 \times 0.451 = 2.706$ .

20.  $Y_{h2} - Y'_{bh} = 5.677 - 0.451 = 5.226$ .

21.  $f_2(Y_{h2} - Y'_{bh}) = 22.7 \times 5.226 = 118.63$ .

22.  $f_{h1}Y'_{bh} + f_2(Y_{h2} - Y'_{bh}) = 2.706 + 118.630 = 121.336$ .

23.  $A'_{ch2} = \frac{f_{h1}Y'_{bh} + f_2(Y_{h2} - Y'_{bh})}{F} = \frac{121.336}{15.000} = 8.089$ .

24.  $P'_{ch2} = 100A'_{ch2} = 100 \times 8.089 = 808.9 =$  percentage of lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can in 48 minutes of heating. (See curves XII-A, chart 7, sections A and A'.)

NOTE H: If the desired percentage is to include effective lethal heat during cooling of can (assuming that water cooling of can begins  $x'_{h2}$  [48] minutes after beginning of process), the solution is like that just given except that in place of equation (13) we have equation (14):

$$P_{h2} = 100A_{h2} = 100 \frac{\theta_{h2} f_{h1} Y'_{bh} + f_2 \left[ \frac{Y_{h2}}{\rho_{h2}} - \theta_{h2} Y'_{bh} \right]}{F} \quad (14)$$

and in place of steps 20—24 are substituted the following 16 steps:

- 20a. On chart 6, extrapolating for curve representing  $z = 18^\circ$ ,  $m + g = 190^\circ$ ; find, for  $g'_{h2} = 0.112^\circ$ ;  $\rho_{h2} = 0.9464$ .

$$21a. \frac{Y_{h2}}{\rho_{h2}} = \frac{5.677}{0.946} = 6.00.$$

$$22a. \frac{g'_{bh}}{g'_{h2}} = \frac{6.54}{0.112} = 58.3.$$

$$23a. \text{Log } \frac{g'_{bh}}{g'_{h2}} = \log 58.3 = 1.765.$$

$$24a. \frac{f_{h1}}{f_2} = \frac{6.0}{22.7} = 0.264.$$

$$25a. \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2}} = 0.264 \times 1.765 = 0.465.$$

NOTE Ha: When  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2}}$  (step 25a) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_{h2}$  may be taken as 1.0, and steps 26a—28a, below, may be omitted. They are included here merely to give the method.

$$26a. 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2}} = 10 \times 0.465 = 4.65.$$

$$27a. \text{Log}^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2}} \right] = \log^{-1} 4.65 = 44,420.$$

$$28a. \theta_{h2} = \frac{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2}} \right]}{\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2}} \right] + \rho_{h2} - 1} = \frac{44,420}{44,420 + 0.946 - 1} = \frac{44,420}{44,419.946} = 1.000.$$

$$29a. \theta_{h2} Y'_{bh} = 1.000 \times 0.451 = 0.451.$$

$$30a. \frac{Y_{h2}}{\rho_{h2}} - \theta_{h2} Y'_{bh} = 6.000 - 0.451 = 5.549.$$

$$31a. f_2 \left[ \frac{Y_{h2}}{\rho_{h2}} - \theta_{h2} Y'_{bh} \right] = 22.7 \times 5.549 = 125.962.$$

$$32a. \theta_{h2} f_{h1} Y'_{bh} = 1.000 \times 2.706 = 2.706.$$

$$33a. \theta_{h2} f_{h1} Y'_{bh} + .2 \left[ \frac{Y_{h2}}{\rho_{h2}} - \theta_{h2} Y'_{bh} \right] = 2.706 + 125.962 = 128.668.$$

$$34a. A'_{h2} = \frac{\theta_{h2} f_{h1} Y'_{bh} + f_2 \left[ \frac{Y_{h2}}{\rho_{h2}} - \theta_{h2} Y'_{bh} \right]}{F} = \frac{128.67}{15.00} = 8.578.$$

35a.  $P'_{h2} = 100A'_{h2} = 100 \times 8.578 = 857.8$  = percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can during 48 minutes of heating plus necessary time for cooling in water.

NOTE Ha<sup>1</sup>: If we subtract the result in step 24 from that in step 35a, we have  $857.8 - 808.9 = 48.9$  per cent. This brings out the interesting fact that the amount of lethal heat effective at center of can during the cooling period alone is, in this case, almost half of that necessary to sterilize the contents of the can.

## PROBLEM XII-B

Simple process. Calculation of the amount of lethal heat at center of can up to a given time, expressed as percentage of heat necessary to sterilize; when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ); and
2.  $(RT - CT'_{h2})$  is less than  $0.1^\circ$  (see note F).

Specifications:

- (1) Product..... (W)
- (2) Size of can..... (No. 2)
- (3) Slope of thermal death time curve..... ( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....  
..... ( $F = 15$  minutes)
- (5) Retort temperature..... ( $RT = 230^\circ$ )
- (6) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve..... ( $x'_{bh} = 8$  minutes)  
[The value of  $CT'_{bh}$  may be specified instead of  $x'_{bh}$  (see notes A and C)]
- (7) Slope of heating curve before break..... ( $f_{h1} = 6$  minutes)
- (8) Slope of heating curve after break..... ( $f_2 = 22.7$  minutes)
- (9) Initial temperature..... ( $IT = 160^\circ$ )
- (10)  $j = 1.41$ .

Find percentage ( $P'_{ch2} < .1$ ) of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to 48 ( $x'_{h2}$ ) minutes after beginning of process.

NOTE A: If value of  $CT'_{bh}$  were given instead of that of  $x'_{bh}$  [item (6) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note C.

NOTE B: Instead of  $x'_{h2}$ , the value of  $CT'_{h2}$  (temperature at center of can  $x'_{h2}$  minutes after beginning of process) may be specified. If  $CT'_{h2}$  were specified, the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note E.



Solution:

$$1. I = RT - IT = 230^\circ - 160^\circ = 70^\circ.$$

$$2. jI = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ.$$

NOTE C: Steps 3—7, below, are in accordance with solution of problem X-A (steps 3—7). If value of  $CT'_{bh}$  were given as a condition of the problem instead of  $x'_{bh}$  [item (6) under Specifications]; steps 3—7, below, would be replaced by steps 3—6 from solution of problem X-B.

$$3. \text{ On chart 4; find, for } jI = 98.7^\circ, B''_{kh} = 2.994 \text{ minutes.}$$

$$4. \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = \frac{8}{6} = 1.333 \text{ minutes.}$$

$$5. B'_{kbh} = B''_{kh} - \frac{x'_{bh}}{f_{h1}} = 2.994 - 1.333 = 1.661 \text{ minutes.}$$

$$6. \text{ On chart 4; find, for } B'_{kbh} = 1.661 \text{ minutes, } g'_{bh} = 4.62^\circ.$$

$$7. CT'_{bh} = RT - g'_{bh} = 230^\circ - 4.62^\circ = 225.38^\circ.$$

NOTE D: Since  $x'_{h2}$  (48 minutes) is greater than  $x'_{bh}$  (8 minutes), the point to be determined falls after the break in heating curve. Thus, steps 8—10, below, are analogous to steps 12—14 of solution of problem X-A. If point to be determined fell before break in heating curve, steps 8—9 of solution of problem X-A would be followed. In latter case, symbol  $x'_{h1}$ , should be used instead of  $x'_{h2}$ .

NOTE E: If value of  $CT'_{h2}$  were given as a condition of the problem instead of  $x'_{h2}$ , steps 8—10, below, would be replaced by the simple step:

$$7a. \quad g'_{h2} = RT - CT'_{h2} = 230^\circ - CT'_{h2}$$

$$8. x'_{h2} - x'_{bh} = 48 - 8 = 40 \text{ minutes.}$$

$$9. \frac{x'_{h2} - x'_{bh}}{f_2} = \frac{40.0}{22.7} = 1.761 \text{ minutes.}$$

$$10. B'_{kh2} = B'_{kbh} - \frac{x'_{h2} - x'_{bh}}{f_2} = 1.661 - 1.761 = -0.100 \text{ minute.}$$

NOTE F: Since  $B'_k$  is negative, we know that  $RT - CT'_{h2}$  is less than  $0.1^\circ$ , and  $CT'_{h2}$  is practically  $230^\circ$ . Thus, the symbol,  $x'_{h2} < .1$ , must be substituted for the symbol  $x'_{h2}$ . If  $B'_{kh2}$  were found to be positive, it would show that  $RT - CT'_{h2}$  is greater than  $0.1^\circ$ ; in which case, the solution from this point would follow that of problem XII-A (steps 11—24).

11. Use equation (14):

$$P'_{ch2} < .1 = 100A'_{ch2} < .1 = 100 \left[ \frac{f_{h1}Y'_{bh} + f_2(Y_{h2.1} - Y'_{bh})}{F} + \frac{B'_{h2} < .1}{U} \right] \quad (15)$$

NOTE G: If point to be determined fell before break in heating curve, this problem would be same as a simple heating curve problem; the symbols,  $g'$  and  $B'$ , would be used instead of  $g'_{h2}$  and  $B'_{h2}$  respectively; and, since we should have the condition,  $f_{h1} = f_2$ , equation (15) would assume the form of equation (5) if  $RT - CT'$  were less than  $0.1^\circ$ ; and the solution from this point would follow that of problem VI-B (steps 9—20). If  $RT - CT'$  were greater than  $0.1^\circ$ , equation (3) would be used; as in the solution of problem VI-A (steps 10—16).

12.  $m+g=RT-CW=230^{\circ}-70^{\circ}=160^{\circ}$ .
13. On chart 5, on curve representing  $z=18^{\circ}$ ; find, for  $g'_{bh}=4.62^{\circ}$ ,  $Y'_{220\ bh}=0.00434$ ; and, for  $g=0.1^{\circ}$ ,  $Y_{220\ h2\ .1}=0.0353$ .
14. On chart 2, on curve for  $z=18^{\circ}$ ; find, for  $RT=230^{\circ}$ ,  $z'_{bh}(=Z_{h2\ .1})=3.61$ .
15.  $Y'_{bh}=Z'_{bh}Y_{220\ bh}=3.61\times 0.00434=0.0157$ .
16.  $Y_{h2\ 1}=Z_{h2\ .1}Y_{220\ h2\ .1}=3.61\times 0.0353=0.1274$ .
17. On chart 2, on curve,  $z=18^{\circ}$ ; find, for  $RT=230^{\circ}$  on scale A,  $F_i=12.9$  minutes.
18.  $U=FF_i=15\times 12.9=193.5$  minutes.
19.  $B'_{h2\ <.1}=-f_2B'_{kh2}=22.7\times (-0.1)=2.27$  minutes.
20.  $\frac{B'_{h2\ <.1}}{U}=\frac{2.27}{193.5}=0.0117$ .
21.  $f_{h2}Y'_{bh}=6\times 0.0157=0.0942$ .
22.  $Y_{h2\ .1}-Y'_{bh}=0.1274-0.0157=0.1117$ .
23.  $f_2(Y_{h2\ .1}-Y'_{bh})=22.7\times 0.1117=2.5356$ .
24.  $f_{h1}Y'_{bh}+f_2(Y_{h2\ .1}-Y'_{bh})=0.0942+2.5356=2.6298$ .
25.  $\frac{f_{h1}Y'_{bh}+f_2(Y_{h2\ .1}-Y'_{bh})}{F}=\frac{2.6298}{15.000}=0.1753$ .
26.  $A'_{ch2\ <.1}=\frac{f_{h1}Y'_{bh}+f_2(Y_{h2\ .1}-Y'_{bh})}{F}+\frac{B'_{h2\ <.1}}{U}=0.1753+0.0117=0.1870$ .
27.  $P'_{ch2\ <.1}=100A'_{ch2\ <.1}=100\times 0.187=18.7$ =percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can in 48 minutes of heating. (See curves XII-B, chart 7, sections B and B'.)

NOTE H: If the desired percentage is to include effective lethal heat during cooling of can (assuming that water cooling of can begins  $x'_{h2}$  [48] minutes after beginning of process), the solution is like that just given except that, in place of equation (15) we have equation (16):

$$P'_{h2\ <.1}=100A'_{h2\ <.1}=100\left[\frac{\theta_{h2\ <.1}f_{h1}Y'_{bh}+f_2\left\{\frac{Y_{h2\ 1}}{\rho_{h2\ .1}}-\theta_{h2\ <.1}Y'_{bh}\right\}}{F}+\frac{B'_{h2\ <.1}}{U}\right] \quad (16)$$

and, in place of steps 22—27 are substituted the following 17 steps:

- 22a. On chart 6, on curve representing  $z=18^{\circ}$ ,  $m+g=160^{\circ}$ ; find, for  $g=0.1^{\circ}$ ,  $\rho_{h2\ .1}=0.9451$ .
- 23a.  $\frac{Y_{h2\ .1}}{\rho_{h2\ .1}}=\frac{0.1274}{0.9451}=0.1349$ .
- 24a.  $\frac{g'_{bh}}{g'_{h2\ <.1}}=\frac{4.62}{\text{less than } 0.1}=\text{greater than } 46.2$ .
- 25a.  $\text{Log } \frac{g'_{bh}}{g'_{h2\ <.1}}=\text{log } 46.2=1.665$ .
- 26a.  $\frac{f_{h1}}{f_2}=\frac{6.0}{22.7}=0.264$ .

$$27a. \frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2} < .1} = 0.264 \times 1.665 = 0.440.$$

NOTE Ha: If  $\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2} < .1}$  (step 27a) is equal to or greater than 0.3, the value of  $\theta_{h2} < .1$  may be taken as 1.0, and steps 28a—30a, below, may be omitted. They are included here merely to give the method.

$$28a. 10^{\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2} < .1}} = 10 \times 0.44 = 4.4.$$

$$29a. \text{Log}^{-1} \left[ 10^{\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2} < .1}} \right] = \log^{-1} 4.4 = 25,130.$$

$$30a. \theta_{h2} < .1 = \frac{\log^{-1} \left[ 10^{\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2} < .1}} \right]}{\log^{-1} \left[ 10^{\frac{f_{h1}}{f_2} \log \frac{g'_{bh}}{g'_{h2} < .1}} \right] + \rho_{h2} .1 - 1} = \frac{25,130}{25,130 + 0.945 - 1} \\ = \frac{25,130}{25,129.945} = 1.000.$$

$$31a. \theta_{h2} < .1 Y'_{bh} = 1.000 \times 0.0157 = 0.0157.$$

$$32a. \frac{Y_{h2} .1}{\rho_{h2} .1} - \theta_{h2} < .1 Y'_{bh} = 0.1349 - 0.0157 = 0.1192.$$

$$33a. f_2 \left\{ \frac{Y_{h2} .1}{\rho_{h2} .1} - \theta_{h2} < .1 Y'_{bh} \right\} = 22.7 \times 0.1192 = 2.706.$$

$$34a. \theta_{h2} < .1 f_{h1} Y'_{bh} = 1.000 \times 0.0942 = 0.0942.$$

$$35a. \theta_{h2} < .1 f_{h1} Y'_{bh} + f_2 \left\{ \frac{Y_{h2} .1}{\rho_{h2} .1} - \theta_{h2} < .1 Y'_{bh} \right\} = 0.0942 + 2.706 = 2.800.$$

$$36a. \frac{\theta_{h2} < .1 f_{h1} Y'_{bh} + f_2 \left\{ \frac{Y_{h2} .1}{\rho_{h2} .1} - \theta_{h2} < .1 Y'_{bh} \right\}}{F} = \frac{2.8}{15.0} = 0.1867.$$

$$37a. A'_{h2} < .1 = \frac{\theta_{h2} < .1 f_{h1} Y'_{bh} + f_2 \left\{ \frac{Y_{h2} .1}{\rho_{h2} .1} - \theta_{h2} < .1 Y'_{bh} \right\}}{F} + \frac{B'_{h2} < .1}{U} = 0.1867 + 0.0117 \\ = 0.1984.$$

$$38a. P'_{h2} < .1 = 100 A'_{h2} < .1 = 100 \times 0.1984 = 19.84 = \text{percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can during 48 minutes of heating, plus necessary time for cooling.}$$

## III

SYMBOLS USED IN CLASS 2, GROUP 1, PROBLEMS XIII-A TO XIX-B,  
INCLUSIVE. DIVIDED PROCESS; HEATING CURVE (FOR ONE  
RETORT TEMPERATURE), A SIMPLE LOGARITHMIC  
CURVE

THE SYMBOLS AND DEFINITIONS GIVEN BELOW REFER TO THE PROCESS THAT IS BEING CALCULATED. ALL SYMBOLS USED IN THE PROBLEMS, TO WHICH IS APPENDED THE SUBSCRIPT,  $a$ , ARE DEFINED AS GIVEN BELOW FOR THE SAME SYMBOLS WITHOUT THIS SUBSCRIPT; BUT THEY REFER, NOT TO THE PROCESS BEING CALCULATED, BUT TO A GIVEN PROCESS, AN EQUIVALENT OF WHICH IS BEING CALCULATED.

- $A'_{b1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $A'_{b2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{b2}$  or  $g'_{b2}$  degrees below second retort temperature ( $RT_2$ ) if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $A'_1$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $A'_2$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_2$  degrees below second retort temperature ( $RT_2$ ).
- $A''_2$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_2$  or  $g'_2$  degrees below second retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature  $RT_2$ .



- $A'_{2 \cdot 1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below second retort temperature ( $RT_2$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $A''_{2 \cdot 1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below second retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $A'_{2 < .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{h2 < .1}$  degree below second retort temperature ( $RT_2$ ).
- $A''_{2 < .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{2 < .1}$  or  $g'_{2 < .1}$  degree below second retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $A_{cb1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ). By definition,  $A_{cb1} = \rho_{b1}$ .
- $A'_{cb1}$  — $[= \rho'_{b1} A'_{b1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $A_{cb2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{b2}$  degrees below second retort temperature ( $RT_2$ ) if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $A'_{cb2}$  — $[= \rho'_{b2} A'_{b2}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g'_{b2}$  degrees below second retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $A_{c1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ). By definition,  $A_{c1} = \rho_1$ .
- $A'_{c1}$  — $[= \rho'_1 A'_1]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $A_{c2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_2$  degrees below second retort temperature ( $RT_2$ ).

- $A'_{c2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_2$  degrees below second retort temperature ( $RT_2$ ).
- $A''_{c2}$  — $[= \rho_2 A''_2]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_2$  or  $g'_2$  degrees below second retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $A_{c2.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $A'_{c2.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $A''_{c2.1}$  — $[= \rho_{2.1} A''_{2.1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $A_{c2 < .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{2 < .1}$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $A'_{c2 < .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{2 < .1}$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $A''_{c2 < .1}$  — $[= \rho_{2.1} A''_{2 < .1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{2 < .1}$  or  $g'_{2 < .1}$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature ( $RT_2$ ).
- $a$  —Subscript used with symbols, when they refer to a given process, an equivalent of which is being calculated.
- $B_{B2}$  —Length of process in minutes.
- $B_{b1}$  — $[= f_{h1} B_{kb1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), if retort temperature remained constant and equal to  $RT_1$ .
- $B'_{b1}$  — $[= f_{h1} B'_{kb1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), if retort temperature remained constant and equal to  $RT_1$ .

- $B_{b2}$  — $[=f_h B_{kb2}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $B'_{b2}$  — $[=f_h B'_{kb2}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $B_1$  — $[=f_h B_{k1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), if retort temperature remained constant and equal to  $RT_1$ .
- $B'_1$  — $[=f_h B'_{k1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), if retort temperature remained constant and equal to  $RT_1$ .
- $B_2$  — $[=f_h B_{k2}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $B'_2$  — $[=f_h B'_{k2}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $B_2 < .1$  — $[=f_h B_{k2 < .1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $g_2 < .1$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $B'_2 < .1$  — $[=f_h B'_{k2 < .1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $g'_2 < .1$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $B''_1$  — $[=f_h B''_{k1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $B''_{o1}$  — $[=f_h B''_{ko1}]$ —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1 j$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $B_{kb1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B'_{kb1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B_{kb2}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), when  $f_h = 1$ .



- $B'_{kb2}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B_{k1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B'_{k1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B_{k2}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B'_{k2}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B_{k2 < .1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $g_2 < .1$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B'_{k2 < .1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ) to  $g'_2 < .1$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), when  $f_h = 1$ .
- $B''_{k1}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ$  below first retort temperature ( $RT_1$ ), if  $f_h = 1$ .
- $B''_{k01}$  —The number of minutes that would be required for temperature at center of can to rise from  $I_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) to  $0.1^\circ j$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ), if  $f_h = 1$ .
- $C_{b1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ), assuming conditions,  $t_{b1} = 1$  and  $f_h = 1$ .
- $C'_{b1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ), assuming conditions,  $t'_{b1} = 1$  and  $f_h = 1$ .
- $C_{b2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), if  $t_{b2} = 1$  and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , with  $f_h = 1$ .



- $C'_{b2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) if  $t'_{b2}=1$  and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , with  $f_h=1$ .
- $C_1$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ) assuming the conditions,  $t_1=1$  and  $f_h=1$ .
- $C'_1$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ), assuming the conditions,  $t'_1=1$  and  $f_h=1$ .
- $C_2$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_2$  or  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), if  $t_2$  or  $t'_2=1$  and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , with  $f_h=1$ .
- $C_{2.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), if  $t_{2.1}$  or  $t'_{2.1}=1$  and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , with  $f_h=1$ .
- $C_{2<.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{2<.1}$  or  $g'_{2<.1}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), if  $t_{2<.1}$  or  $t'_{2<.1}=1$  and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , with  $f_h=1$ .
- $CT_b$  —Temperature at center of can at instant of change in temperature of process when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of change in retort temperature, would be just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $CT'_b$  —Temperature at center of can at instant of change in temperature of process when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of change in retort temperature, would be either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $CT_1$  — $[=RT_1-g_1]$ —Temperature at center of can at the instant before the change in retort temperature when this temperature is  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).

- $CT'_1$  —  $[=RT_1 - g'_1]$ —Temperature at center of can at the instant before the change in retort temperature when this temperature is  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $CT_2$  —  $[=RT_2 - g_2]$ —Temperature at center of can at the instant after the change in retort temperature when this temperature is  $g_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $CT'_2$  —  $[=RT_2 - g'_2]$ —Temperature at center of can at the instant after the change in retort temperature when this temperature is  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $CT_{M2}$  —Maximum temperature attained at center of can when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $CW$  —Temperature of cooling water.
- $F$  —Number of minutes required to destroy organism at  $250^\circ$ .
- $F_{i1}$  —  $\left[ = \frac{U_1}{F} \right]$ —Number of minutes required to destroy organism at first retort temperature ( $RT_1$ ) when  $F = 1$ .
- $F_{i2}$  —  $\left[ = \frac{U_2}{F} \right]$ —Number of minutes required to destroy organism at final retort temperature ( $RT_2$ ), when  $F = 1$ .
- $F_o$  —The "order" of a process, representing the number of minutes required to destroy organism at  $250^\circ$  when  $z$  (of the real or the assumed thermal death time curve) equals  $18^\circ$ .  $F_o$  serves as a standard by means of which the sterilizing values of different processes may be compared. "A process of order, 10", for instance, is a process which, theoretically, gives 100 per cent sterilization when calculated on the basis of a thermal death time curve passing through the point, 10 minutes,  $250^\circ$ , and having a slope,  $z$ , of  $18^\circ$ .
- $f_h$  —Represents slope of heating curve.
- $g_{b1}$  —Difference in degrees between first retort temperature ( $RT_1$ ) and temperature at center of can at instant of change in retort temperature when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of change in retort temperature, would be just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g'_{b1}$  —Difference in degrees between first retort temperature ( $RT_1$ ) and temperature at center of can at instant of change in retort temperature when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of change in retort temperature, would be either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.

- $g_{b2}$  —Difference in degrees between final retort temperature ( $RT_2$ ) and temperature at center of can at instant of change in retort temperature when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of change in retort temperature, would be just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g'_{b2}$  —Difference in degrees between final retort temperature ( $RT_2$ ) and temperature at center of can at instant of change in retort temperature when the process (heating and cooling portions combined), if steam were turned off and water cooling begun at the instant of change in retort temperature, would be either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g_1$  —Difference in degrees between first retort temperature ( $RT_1$ ) and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process when this temperature is reached before the point of change in retort temperature.
- $g'_1$  —Difference in degrees between first retort temperature ( $RT_1$ ) and temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant before the change in retort temperature when the process (heating and cooling portions combined), with steam turned off and water cooling begun at the given instant, is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g_2$  —Difference in degrees between final retort temperature ( $RT_2$ ) and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process when this temperature is reached after the point of change in retort temperature.
- $g'_2$  —Difference in degrees between final retort temperature ( $RT_2$ ) and temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant after the change in retort temperature when the process (heating and cooling portions combined), with steam turned off and water cooling begun at the given instant, is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $g_2 < .1$  —Difference in degrees between final retort temperature ( $RT_2$ ) and the maximum temperature that must be attained at center of can to accomplish sterilization during the combined heating and cooling portions of the process when the difference between this temperature and final retort temperature ( $RT_2$ ) is less than  $0.1^\circ$ .
- $g'_2 < .1$  —Difference in degrees between final retort temperature ( $RT_2$ ) and temperature at center of can at any arbitrarily chosen instant when the difference between this temperature and final retort temperature ( $RT_2$ ) is less than  $0.1^\circ$  and when the process (heating and cooling portions combined) with steam turned off and water cooling begun at the given instant, is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.



- $h_b$  —The number of minutes required to complete a process after the temperature at center of can reaches  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ). By definition,  $h_b = B_2 < .1$ .
- $I_1$  —Difference in degrees between first retort temperature ( $RT_1$ ) and initial temperature ( $IT$ ).
- $I_2$  —Difference in degrees between final retort temperature ( $RT_2$ ) and initial temperature ( $IT$ ).
- $IT$  —Initial temperature of can.
- $j$  —An arbitrary factor, which, when multiplied by  $I_1$ , designates the point of intersection of the vertical line representing the beginning of a process with the extension of the straight portion of the semi-log heating curve, when no time is consumed in bringing the retort to processing temperature.  $j$  has a similar application with reference to the cooling curve when it is multiplied by the quantity,  $m_b$ . See paragraphs 5 and 6 of Introduction.
- $m_b$  —Difference in degrees between cooling water temperature ( $CW$ ) and the maximum temperature attained at center of can.
- $(m+g)_1$  —Difference in degrees between first retort temperature ( $RT_1$ ) and cooling water temperature ( $CW$ ).
- $(m+g)_2$  —Difference in degrees between final retort temperature ( $RT_2$ ) and cooling water temperature ( $CW$ ).
- $P'_{b1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $P'_{b2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{b2}$  or  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $P'_1$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $P'_2$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $P''_2$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_2$  or  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .



- $P'_{2\ .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $0.1^\circ$  below second retort temperature ( $RT_2$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $P''_{2\ .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $0.1^\circ$  below second retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $P'_{2\ <.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attains temperature  $g'_{2\ <.1}$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $P''_{2\ <.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can during combined heating and cooling portions of a process in which the can attained temperature  $g_{2\ <.1}$  or  $g'_{2\ <.1}$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $P_{cb1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).  $P_{cb1} = 100\rho_{b1}$ .
- $P'_{cb1}$  — $[=\rho'_{b1}P'_{b1}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $P_{cb2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $P'_{cb2}$  — $[=\rho'_{b2}P'_{b2}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $P_{c1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).  $P_{c1} = 100\rho_1$ .
- $P'_{c1}$  — $[=\rho'_1P'_1]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $P_{c2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $P'_{c2}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).

- $P''_{c2}$  — $[=\rho_2 P''_2]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_2$  or  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $P_{c2.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $P'_{c2.1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $P''_{c2.1}$  — $[=\rho_{2.1} P''_{2.1}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $P_{c2 < .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{2 < .1}$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $P'_{c2 < .1}$  —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{2 < .1}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $P''_{c2 < .1}$  — $[=\rho_{2.1} P''_{2 < .1}]$ —The percentage of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{2 < .1}$  or  $g'_{2 < .1}$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ), if the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $RT_1$  —First retort temperature.
- $RT_2$  —Second retort temperature.
- $\rho_{b1}$  —The fraction of the total lethal value of a process which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ). By definition,  $\rho_{b1} = A_{cb1}$ .
- $\rho'_{b1}$  —The fraction of the total lethal value of a process which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $\rho_{b2}$  —The fraction of the total lethal value of process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $g_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ) and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .

- $\rho'_{b2}$  —The fraction of the total lethal value of a process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $\rho_1$  —The fraction of the total lethal value of a process, which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ). By definition,  $\rho_1 = A_{c1}$ .
- $\rho'_1$  —The fraction of the total lethal value of a process, which is represented by the heating portion only when the maximum temperature reached at center of can is  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $\rho_2$  —The fraction of the total lethal value of a process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $g_2$  or  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ), and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $\rho_{2.1}$  —The fraction of the total lethal value of a process, which would be represented by the heating portion only, if the maximum temperature reached at center of can were  $0.1$ ,  $g_2 < .1$  or  $g'_2 < .1$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ), and the process were a simple process of retort temperature,  $RT_2$ .
- $s$  —The algebraic difference in degrees:  $RT_1$  minus  $RT_2$ .
- $t_{b1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $t'_{b1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $t_{b2}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $t'_{b2}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $t_1$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $t'_1$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $t_2$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $t'_2$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $t_{2.1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is just sufficient to sterilize the food in the cans if the maximum temperature attained at center of can is  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ).



- $t'_{2.1}$  —The time in minutes required to destroy the organism at temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ) when the process (heating and cooling portions combined) is either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans if the maximum temperature attained at center of can is  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $U_1$  —Number of minutes necessary to destroy organism at first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $U_2$  —Number of minutes necessary to destroy organism at final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $V$  — $\left[ = \frac{f_h Y_2}{F \rho_2} \right]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can in a complete simple process (heating and cooling); if slope of heating curve were  $f_h$  (and constant), retort temperature were  $RT_2$ , and the maximum temperature attained at center of can were the same as that which must be attained for sterility in the divided process being calculated, in which the second retort temperature is  $RT_2$ .  $V$ , divided into  $f_h$ , gives the pseudo-slope;

$$f \left[ = \frac{f_h}{V} = \frac{F \rho_2}{Y_2} \right]$$

In problems, the value of  $V$  is obtained from the formula:

$$V = 1 + \frac{f_h(Y'_{b2} - Y'_{b1})}{F}$$

- $x_b$  —Number of minutes from beginning of process to the instant of change in retort temperature, when the process (heating and cooling portions combined) if steam were turned off and water cooling begun at the instant of change in retort temperature, would be just sufficient to sterilize the food in the cans.
- $x'_b$  —Number of minutes from beginning of process to the instant of change in retort temperature, when the process (heating and cooling portions combined) if steam were turned off and water cooling begun at the instant of change in retort temperature, would be either less than or more than sufficient to sterilize the food in the cans.
- $x_c$  —Number of minutes necessary to hold can at second retort temperature ( $RT_2$ ) to give a sterilizing process when the difference between final retort temperature ( $RT_2$ ) and the maximum temperature attained at center of can is not less than  $0.1^\circ$ .
- $x_{c < .1}$  —Number of minutes necessary to hold can at second retort temperature ( $RT_2$ ) to give a sterilizing process when the difference between final retort temperature ( $RT_2$ ) and the maximum temperature attained at center of can is less than  $0.1^\circ$ .
- $x_1$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).



- $x'_1$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $x_2$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ). By definition,  $x_2 = x'_b + x_c$ .
- $x'_2$  —Number of minutes from beginning of process to the instant at which the center of can attains temperature  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $Y_{b1}$  — $[=Z_{b1}Y_{220\ b1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ); assuming conditions,  $F=1$ , and slope of heating curve equals 1.  $RT_1$  has any value.
- $Y'_{b1}$  — $[=Z'_{b1}Y'_{220\ b1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ); assuming conditions,  $F=1$ , and slope of heating curve equals 1.  $RT_1$  has any value.
- $Y_{b2}$  — $[=Z_{b2}Y_{220\ b2}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , and the slope of heating curve equals 1.  $RT_2$  has any value.
- $Y'_{b2}$  — $[=Z'_{b2}Y'_{220\ b2}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , and the slope of heating curve equals 1.  $RT_2$  has any value.
- $Y_1$  — $[=Z_1Y_{220\ 1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to time can attains temperature  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ); assuming conditions,  $F=1$ , and slope of heating curve equals 1.  $RT_1$  has any value.
- $Y'_1$  — $[=Z'_1Y'_{220\ 1}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to time can attains temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ); assuming conditions,  $F=1$ , and slope of heating curve equals 1.  $RT_1$  has any value.
- $Y_2$  — $[=Z_2Y_{220\ 2}]$ —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_2$  or  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , and the slope of heating curve equals 1.  $RT_2$  has any value.

- $Y_{2 .1}$  — [=  $Z_{2 .1} Y_{220 2 .1}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , and the slope of heating curve equals 1.  $RT_2$  has any value.
- $Y_{2 <.1}$  — [=  $Z_{2 <.1} Y_{220 2 <.1}$ ]—The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{2 <.1}$  or  $g'_{2 <.1}$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2$ , and the slope of heating curve equals 1.  $RT_2$  has any value.
- $Y_{220 b1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ); assuming conditions,  $F=1$ , slope of heating curve equals 1, and  $RT_1=220^\circ$ .
- $Y'_{220 b1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_{b1}$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ); assuming conditions,  $F=1$ , slope of heating curve equals 1, and  $RT_1=220^\circ$ .
- $Y_{220 b2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the slope of heating curve equals 1, and the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2=220^\circ$ .
- $Y'_{220 b2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g'_{b2}$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the slope of heating curve equals 1, and the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2=220^\circ$ .
- $Y_{220 1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ); assuming conditions,  $F=1$ , slope of heating curve equals 1, and  $RT_1=220^\circ$ .
- $Y'_{220 1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to the time the can attains temperature  $g'_1$  degrees below first retort temperature ( $RT_1$ ); assuming conditions,  $F=1$ , slope of heating curve equals 1, and  $RT_1=220^\circ$ .
- $Y_{220 2}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_2$  or  $g'_2$  degrees below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the slope of heating curve equals 1, and the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2=220^\circ$ .

- $Y_{220\ 2\ .1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $0.1^\circ$  below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the slope of heating curve equals 1, and the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2=220^\circ$ .
- $Y_{220\ 2\ <.1}$  —The fraction of the lethal heat necessary to sterilize, which would be effective at center of can up to the time the can attained temperature  $g_2\ <.1$  or  $g'_2\ <.1$  degree below final retort temperature ( $RT_2$ ); assuming the conditions,  $F=1$ , the slope of heating curve equals 1, and the process is a simple process of retort temperature,  $RT_2=220^\circ$ .
- $y_1$  —The temperature co-ordinate of the portion of the heating curve preceding the change in retort temperature. It represents the number of degrees to first retort temperature ( $RT_1$ ).
- $y_2$  —The temperature co-ordinate of the portion of the heating curve after the change in retort temperature. It represents the number of degrees to final retort temperature ( $RT_2$ ).
- $Z_{b1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ b1}$  to a value ( $Y_{b1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{b1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $Z'_{b1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y'_{220\ b1}$  to a value ( $Y'_{b1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z'_{b1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $Z_{b2}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ b2}$  to a value ( $Y_{b2}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{b2}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $Z'_{b2}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y'_{220\ b2}$  to a value ( $Y'_{b2}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{b2}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $Z_1$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ 1}$  to a value ( $Y_1$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_1$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $Z'_1$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y'_{220\ 1}$  to a value ( $Y'_1$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z'_1$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $Z_2$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ 2}$  to a value ( $Y_2$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_2$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $Z_{2\ .1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ 2\ .1}$  to a value ( $Y_{2\ .1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{2\ .1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $Z_{2\ <.1}$  —Arbitrary factor, used to convert  $Y_{220\ 2\ <.1}$  to a value ( $Y_{2\ <.1}$ ) corresponding to a retort temperature other than  $220^\circ$ .  $Z_{2\ <.1}$  is the number whose logarithm is  $(RT-220^\circ)\div z$ .
- $z$  —Represents slope of thermal death time curve.

## PROBLEM XIII-A

Divided process. Calculation of length of process, when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The time of occurrence of change in retort temperature is given [item (7) under Specifications]; and
3.  $(RT_2 - CT_{M2})$  is greater than  $0.1^\circ$  (see note B).

Specifications:

- (1) Product.....(Corn)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy organism at  $250^\circ$ .....( $F = 15$  minutes)
- (5) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (6) Second retort temperature.....( $RT_2 = 242^\circ$ )
- (7) Number of minutes retort held at first retort temperature..( $x'_b = 80$  minutes)
- (8) Initial temperature.....( $IT = 180^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (10)  $j = 1.41$ .

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization.  $B_{B2} = x'_b + x_c$ ,  $x_c$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the point of change in retort temperature.

NOTE A: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (7) under Specifications], the method of solution given for problem XIII-C would be used.

Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curves 19.5 on chart 1, find  $f_h = 195$  minutes for No. 10 cans.
3.  $s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 242^\circ = 8^\circ$ .
4.  $I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ$ .
5.  $jI_1 = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI_1 = 98.7^\circ$ ,  $B''_{k1} = 2.994$  minutes.
7.  $\frac{x'_b}{f_2} = \frac{80}{195} = 0.410$ .
8.  $B'_{kb1} = B''_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 2.994 - 0.410 = 2.584$  minutes.
9. On chart 4; find, for  $B'_{kb1} = 2.584$  minutes,  $g'_{b1} = 38.3^\circ$ .
10.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 38.8^\circ - 8.0^\circ = 30.3^\circ$ .
11.  $(m+g)_1 = RT_1 - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$ .
12. Find  $V$  by equation (17):

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$



13. On chart 5, on curve,  $z=18^\circ$  and  $(m+g)_1=180^\circ$ ; find, for  $g'_{b1}=38.3^\circ$ ,  
 $Y'_{220\ b1}=0.0000117$ .
14. On chart 2, on curve for  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_1=250^\circ$  on scale B,  $Z'_{b1}=46.4$ .
15.  $Y'_{b1}=Z'_{b1}Y'_{220\ b1}=46.4\times 0.0000117=0.000543$ .
16.  $(m+g)_2=RT_2-CW=242^\circ-70^\circ=172^\circ$ .
17. On chart 5, interpolating for curve,  $z=18^\circ$  and  $(m+g)_2=172^\circ$ ; find, for  
 $g'_{b2}=30.3^\circ$ ,  $Y'_{220\ b2}=0.0000352$ .
18. On chart 2, on curve for  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_2=242^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2}=16.7$ .
19.  $Y'_{b2}=Z'_{b2}Y'_{220\ b2}=16.7\times 0.0000352=0.000588$ .
20.  $Y'_{b2}-Y'_{b1}=0.000588-0.000543=0.000045$ .
21.  $\frac{Y'_{b2}-Y'_{b1}}{F}=\frac{0.000045}{15}=0.000003$ .
22.  $f_h\frac{Y'_{b2}-Y'_{b1}}{F}=195\times 0.000003=0.000585$ .
23.  $V=1+f_h\frac{Y'_{b2}-Y'_{b1}}{F}=1+0.000585=1.000585$ .
24.  $f=\frac{f_h}{V}=\frac{195}{1.000585}=194.9$ .
25. On chart 2, on curve,  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_2=242^\circ$  on scale A,  $F_{i2}=2.77$  minutes.
26.  $U_2=FF_{i2}=15\times 2.77=41.6$  minutes.
27.  $\frac{f}{U_2}=\frac{194.9}{41.6}=4.68$ .

NOTE B: On chart 3, it is seen that, when  $z=18^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below about  $0.575$  give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  were found less than  $0.1^\circ$ , the method of problem XIII-B (steps 27—40) would be followed from this point.

28. On chart 3, on curve for  $m+g=130^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U_2}=4.68$ ,  
 $g_{2\ 130}=5.45^\circ$ ; and, on curve for  $m+g=180^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U_2}=4.68$ ,  
 $g_{2\ 180}=5.18^\circ$ . Interpolating for  $(m+g)_2=172^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find  $g_2=5.23^\circ$ .
29. Find  $x_c$  by means of equation (18):  

$$x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} \quad (18)$$
30.  $\text{Log } \frac{g'_{b2}}{g_2} = \text{log } \frac{30.3}{5.23} = \text{log } 5.80 = 0.764$ .
31.  $x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} = 195 \times 0.764 = 149.0$  minutes.
32.  $B_{B2} = x'_b + x_c = 80 + 149 = 229$  minutes = length of process. (See curves XIII-A, chart 8, sections A and A'.)

## PROBLEM XIII-B

Divided process. Calculation of length of process, when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The time of occurrence of change in retort temperature is given [item (7) under Specifications]; and
3. ( $RT_2 - CT_{M2}$ ) is less than  $0.1^\circ$  (see note B).

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18.5^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....( $F = 15$  minutes)
- (5) First retort temperature.....( $RT_1 = 260^\circ$ )
- (6) Second retort temperature.....( $RT_2 = 244^\circ$ )
- (7) Number of minutes retort held at first retort temperature..( $x'_b = 10$  minutes)
- (8) Initial temperature.....( $IT = 140^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (10)  $j = 1.41$ .

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization.  $B_{B2} = x'_b + x_{c < .1}$ ;  $x_{c < .1}$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the point of change in retort temperature.

NOTE A: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (7) under Specifications], the method of solution given for problem XIII-D would be used.

Solution:

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1; find  $f_h = 13$  minutes for No. 10 cans.
3.  $s = RT_1 - RT_2 = 260^\circ - 244^\circ = 16^\circ$ .
4.  $I_1 = RT_1 - IT = 260^\circ - 140^\circ = 120^\circ$ .
5.  $jI_1 = 1.41 \times 120^\circ = 169.2^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI_1 = 169.2^\circ$ ,  $B''_{k1} = 3.227$  minutes.
7.  $\frac{x'_b}{f_h} = \frac{10}{13} = 0.769$ .
8.  $B'_{kb1} = B'_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 3.227 - 0.769 = 2.458$  minutes.
9. On chart 4; find, for  $B'_{kb1} = 2.458$  minutes,  $g'_{b1} = 28.5^\circ$ .
10.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 28.5^\circ - 16.0^\circ = 12.5^\circ$ .
11.  $(m+g)_1 = RT_1 - CW = 260^\circ - 70^\circ = 190^\circ$ .

12. Find
- $V$
- by equation (17):

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$

13. On chart 5, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$  and  $(m+g)_1 = 190^\circ$ ; find, for  $g'_{b1} = 28.5^\circ$ ,  $Y'_{220\ b1} = 0.000051$ .
14. On chart 2, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$ ; find, for  $RT_1 = 260^\circ$  on scale B,  $Z'_{b1} = 142.0$ .
15.  $Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220\ b1} = 142.0 \times 0.000051 = 0.00724$ .
16.  $(m+g)_2 = RT_2 - CW = 244^\circ - 70^\circ = 174^\circ$ .
17. On chart 5, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$  and  $(m+g)_2 = 174^\circ$ ; find, for  $g'_{b2} = 12.5^\circ$ ,  $Y'_{220\ b2} = 0.00094$ .
18. On chart 2, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 244^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2} = 19.7$ .
19.  $Y'_{b2} = Z'_{b2} Y'_{220\ b2} = 19.7 \times 0.00094 = 0.01852$ .
20.  $Y'_{b2} - Y'_{b1} = 0.01852 - 0.00724 = 0.01128$ .
21.  $\frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = \frac{0.01128}{15.0} = 0.000752$ .
22.  $f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 13 \times 0.000752 = 0.009776$ .
23.  $V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 1.00000 + 0.00978 = 1.00978$ .
24.  $f = \frac{f_h}{V} = \frac{13}{1.00978} = 12.88$ .
25. On chart 2, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 244^\circ$  on scale A,  $F_{i2} = 2.13$  minutes.
26.  $U_2 = FF_{i2} = 15 \times 2.13 = 32.0$  minutes.
27.  $\frac{f}{U_2} = \frac{12.88}{32.00} = 0.4025$ .

NOTE B: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18.5^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below approximately 0.565 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . The value of  $g_2 < .1$  therefore, cannot be taken from curves of chart 3. If  $g$  were greater than  $0.1^\circ$ , we should continue from this point by method of problem XIII-A (steps 27—31).

28. Use equation (19):

$$x_{e < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}} \right) \right] \quad (19)$$

29. On chart 5, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $Y_{220\ 2\ .1} = 0.0395$ .
30. On chart 2, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 244^\circ$  on scale B,  $Z_{2\ .1} = 19.7$ . (See step 17.)
31.  $Y_{2\ .1} = Z_{2\ .1} Y_{220\ 2\ .1} = 19.7 \times 0.0395 = 0.7782$ .
32. On chart 6, interpolating for curve,  $z = 18.5^\circ$  and  $(m+g)_2 = 174^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{2\ .1} = 0.9458$ .
33.  $\frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}} = \frac{0.7782}{0.9458} = 0.82068$ .

34.  $Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_2 .1}{\rho_2 .1}=0.01128-0.82068=-0.8094.$  ( $Y_{b2}-Y_{b1}$  is taken from step 19.)
35.  $F_{i2}\left\{Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_2 .1}{\rho_2 .1}\right\}=2.13\times(-0.8094)=-1.726.$
36. Taking  $g'_{b2}$  from step 10,  $\log g'_{b2}=\log 12.5=1.097.$
37.  $1+\log g'_{b2}+F_{i2}\left\{Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_2 .1}{\rho_2 .1}\right\}=1.000+1.097+(-1.726)=$   
 $1.000+1.097-1.726=0.371.$
38.  $f_h\left[1+\log g'_{b2}+F_{i2}\left(Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_2 .1}{\rho_2 .1}\right)\right]=13\times 0.371=4.823.$
39.  $x_{c <.1}=U_2+f_h\left[1+\log g'_{b2}+F_{i2}\left(Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_2 .1}{\rho_2 .1}\right)\right]=32.00+4.82=$   
 $36.82 \text{ minutes}.$
40.  $B_{B2}=x'_b+x_{c <.1}=10.00+36.82=46.82 \text{ minutes=length of process.}$  (See curves XIII-B, chart 8, sections B and B'.)

PROBLEM XIII-C

Divided process. Calculation of length of process, when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The temperature at center of can at time of change is retort temperature is given [item (7) under Specifications]; and
3.  $(RT_2-CT_{M2})$  is greater than  $0.1^\circ$ , (see note B).

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z=20^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....  
.....( $F=15 \text{ minutes}$ )
- (5) First retort temperature.....( $RT_1=240^\circ$ )
- (6) Second retort temperature.....( $RT_2=248^\circ$ )
- (7) Temperature at center of can at time of change in retort temperature....  
.....( $CT'_b=212^\circ$ )
- (8) Initial temperature.....( $IT=180^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW=70^\circ$ )
- (10)  $j=1.41.$

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization.  $B_{B2}=x'_b+x_c$ ;  $x_c$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the point of change in retort temperature.

NOTE A: If value of  $x'_b$  be given instead of that of  $CT'_b$  [item (7) under Specifications], the method of solution given for problem XIII-A should be used.



Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1, find  $f_h = 195$  minutes for No. 10 can.
3.  $s = RT_1 - RT_2 = 240^\circ - 248^\circ = -8^\circ$ .
4.  $I_1 = RT_1 - IT = 240^\circ - 180^\circ = 60^\circ$ .
5.  $jI_1 = 1.41 \times 60^\circ = 84.6^\circ$ .
6.  $g'_{b1} = RT_1 - CT'_b = 240^\circ - 212^\circ = 28^\circ$ .
7. On chart 4; find, for  $jI_1 = 84.6^\circ$ ,  $B''_{k1} = 2.927$  minutes, and, for  $g'_{b1} = 28^\circ$ ,  $B'_{kb1} = 2.445$  minutes.
8.  $\frac{x'_b}{f_h} = B''_{k1} - B'_{kb1} = 2.927 - 2.445 = 0.482$  minute.
9.  $x'_b = f_h \frac{x'_b}{f_h} = 195 \times 0.482 = 93.99$  minutes.
10.  $(m+g)_1 = RT_1 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ$ .
11. Find  $V$  by equation (17):
 
$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$
12. On chart 5, on curve,  $z = 20^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_1 = 170^\circ$ ; find, for  $g'_{b1} = 28^\circ$ ,  $Y'_{220\ b1} = 0.00016$ .
13. On chart 2, on curve for  $z = 20^\circ$ ; find, for  $RT_1 = 240^\circ$  on scale B,  $Z'_{b1} = 10.1$ .
14.  $Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220\ b1} = 10.1 \times 0.00016 = 0.00162$ .
15.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 28^\circ - (-8^\circ) = 28^\circ + 8^\circ = 36^\circ$ .
16.  $(m+g)_2 = RT_2 - CW = 248^\circ - 70^\circ = 178^\circ$ .
17. On chart 5, on curve  $z = 20^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_2 = 178^\circ$ ; find, for  $g'_{b2} = 36^\circ$ ,  $Y'_{220\ b2} = 0.00004$ .
18. On chart 2, on curve for  $z = 20^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 248^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2} = 25.2$ .
19.  $Y'_{b2} = Z'_{b2} Y'_{220\ b2} = 25.2 \times 0.00004 = 0.00101$ .
20.  $Y'_{b2} - Y'_{b1} = 0.00101 - 0.00162 = -0.00061$ .
21.  $\frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = \frac{-0.00061}{15.0} = -0.0000406$ .
22.  $f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 195 \times (-0.00004) = -0.0078$ .
23.  $V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 1.0000 + (-0.0078) = 1.0000 - 0.0078 = 0.9922$ .
24.  $f = \frac{f_h}{V} = \frac{195.00}{0.9922} = 195.5$ .
25. On chart 2, on curve,  $z = 20^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 248^\circ$  on scale A,  $F_{i2} = 1.29$  minutes.
26.  $U_2 = FF_{i2} = 15 \times 1.29 = 19.3$  minutes.
27.  $\frac{f}{U_2} = \frac{195.5}{19.3} = 10.13$ .

NOTE B: On chart 3, it is seen that, when  $z = 20^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below approximately 0.555 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  were found less than  $0.1^\circ$ , the method of problem XIII-D (steps 28—40) would be followed from this point.

28. On chart 3, take curve for  $m+g=180^\circ$ , which is approximately  $178^\circ$  [ $=m+g)_2$ ], and  $z=20^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U_2}=10.13$ ,  $g_2=10.2^\circ$ .
29. Find  $x_c$  by means of equation (18):
- $$x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} \quad (18)$$
30.  $\text{Log } \frac{g'_{b2}}{g_2} = \log \frac{36.0}{10.2} = \log 3.529 = 0.548$ .
31.  $x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} = 195 \times 0.548 = 106.86$ .
32.  $B_{B2} = x'_b + x_c = 93.99 + 106.86 = 200.85$  minutes = length of process. See curves XIII-C, chart 8, sections A and A'.)

### PROBLEM XIII-D

Divided process. Calculation of length of process, when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The temperature at center of can at time of change in retort temperature is given [item (7) under Specifications]; and
3.  $(RT_2 - CT_{M2})$  is less than  $0.1^\circ$  (see note B).

Specifications:

- (1) Products.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 5)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z=18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....( $F=15$  minutes)
- (5) First retort temperature.....( $RT_1=250^\circ$ )
- (6) Second retort temperature.....( $RT_2=240^\circ$ )
- (7) Temperature at center of can at time of change in retort temperature....( $CT'_b=220^\circ$ )
- (8) Initial temperature.....( $IT=180^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW=70^\circ$ )
- (10)  $j=1.41$ .

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization.  $B_{B2} = x'_b + x_{c < .1}$ ;  $x_{c < .1}$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the point of change in retort temperature.

NOTE A: If value of  $x'_b$  were given instead of that of  $CT'_b$  [item (7) under Specifications], the method of solution given for problem XIII-B would be used.

Solution:

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1, find  $f_h=8.8$  minutes for No. 5 can.
3.  $s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ$ .
4.  $I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ$ .

5.  $jI_1 = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ$ .
6.  $g_{b1} = RT_1 - CT'_b = 250^\circ - 220^\circ = 30^\circ$ .
7. On chart 4; find, for  $jI_1 = 98.7^\circ$ ,  $B''_{k1} = 2.994$  minutes; and, for  $g'_{b1} = 30^\circ$ ,  $B'_{kb1} = 2.478$  minutes.
8.  $\frac{x'_b}{f_h} = B''_{k1} - B'_{kb1} = 2.994 - 2.478 = 0.516$  minute.
9.  $x'_b = f_h \frac{x'_b}{f_h} = 8.8 \times 0.516 = 4.54$  minutes.
10.  $(m+g)_1 = RT_1 - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$ .
11. Find  $V$  by equation (17):
 
$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$
12. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$  and  $m+g = 180^\circ$ ; find, for  $g'_{b1} = 30^\circ$ ,  $Y'_{220\ b1} = 0.0000384$ .
13. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_1 = 250^\circ$ ,  $Z'_{b1} = 46.4$ .
14.  $Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220\ b1} = 46.4 \times 0.0000384 = 0.00178$ .
15.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 30^\circ - 10^\circ = 20^\circ$ .
16.  $(m+g)_2 = RT_2 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ$ .
17. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_2 = 170^\circ$ ; find, for  $g'_{b2} = 20^\circ$ ,  $Y'_{220\ b2} = 0.000197$ .
18. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 240^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2} = 12.9$ .
19.  $Y'_{b2} = Z'_{b2} Y'_{220\ b2} = 12.9 \times 0.000197 = 0.00254$ .
20.  $Y'_{b2} - Y'_{b1} = 0.00254 - 0.00178 = 0.00076$ .
21.  $\frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = \frac{0.00076}{15.0} = 0.00005$ .
22.  $f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 8.8 \times 0.00005 = 0.00044$ .
23.  $V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 1.00000 + 0.00044 = 1.00044$ .
24.  $f = \frac{f_h}{V} = \frac{8.8}{1.00044} = 8.8$  (approx.)
25. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 240^\circ$  on scale A,  $F_{i2} = 3.61$  minutes.
26.  $U_2 = FF_{i2} = 15 \times 3.61 = 54.1$  minutes.
27.  $\frac{f}{U_2} = \frac{8.8}{54.1} = 0.163$ .

NOTE B: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . The value of  $g_2 < .1$ , therefore, cannot be taken from curves of chart 3. If  $g$  were greater than  $0.1^\circ$ , we would continue from this point by method of problem XIII-C (steps 28—32).

28. Use equation (19):

$$x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}} \right) \right] \quad (19)$$

29. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $Y_{220\ 2\ .1} = 0.0353$ .

30. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 240^\circ$  on scale B,  $Z_{2.1} = 12.9$ .  
(See step 18.)
31.  $Y_{2.1} = Z_{2.1} Y_{220.2.1} = 12.9 \times 0.0353 = 0.4554$ .
32. On chart 6, on curve for  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_2 = 170^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{2.1} = 0.946$ .
33.  $\frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}} = \frac{0.4554}{0.946} = 0.4814$ .
34.  $Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}} = 0.00076 - 0.4814 = -0.4806$ .  
( $Y'_{b2} - Y'_{b1}$  is taken from step 19.)
35.  $F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}} \right) = 3.61 \times (-0.4806) = -1.735$ .
36. Taking  $g'_{b2}$  from step 15,  $\log g'_{b2} = \log 20 = 1.301$ .
37.  $1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}} \right) = 1 + 1.301 + (-1.735) =$   
 $1 + 1.301 - 1.735 = 0.566$ .
38.  $f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} - F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}} \right) \right] = 8.8 \times 0.566 = 4.98$  minutes.
39.  $x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} - F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}} \right) \right] = 54.10 + 4.98 =$   
 $59.08$  minutes.
40.  $B_{B2} = x'_{b2} + x_{c < .1} = 4.54 + 59.08 = 63.62$  minutes = length of process. (See curves XIII-D, chart 8, sections B and B'.)

#### PROBLEM XIV-A

Divided process. Calculation of a divided process equivalent to a given simple process at any retort temperature when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and
2. ( $RT_2 - CT_{M2}$ ) is greater than  $0.1^\circ$  (see notes E and I).

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )  
[See note A.]
- (4) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (5) Second retort temperature.....( $RT_2 = 240^\circ$ )
- (6) Number of minutes retort held at first retort temperature.....( $x'_b = 80$  minutes)  
[The value of  $CT'_b$  may be specified instead of  $x'_b$  (see notes B and G)]
- (7) Initial temperature.....( $IT = 180^\circ$ )
- (8) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (9)  $j = 1.41$ .
- (10) Process necessary for sterilization at another retort temperature.....  
.....( $B_{Ba} = 160$  minutes when  $RT_a = 245^\circ$ )



Find process,  $B_{B_2}$ , necessary for sterilization with  $250^\circ$ — $240^\circ$  retort temperatures.

$B_{B_2} = x'_b + x_c$ ;  $x_c$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the point of change in retort temperature.

NOTE A: If a value of  $z$  is not specified [item (3) under Specifications], one may be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (6) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note G.

NOTE C: If the given process [item (10) under Specifications] were a divided process, the method of solution would be that of problem XV-A.

Solution:

NOTE D: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—14).

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1 gives  $f_{ha} = 195$  minutes for No. 10 cans.
3.  $I_a = RT_a - IT = 245^\circ - 180^\circ = 65^\circ$ .
4.  $jI_a = 1.41 \times 65^\circ = 91.6^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $jI_a = 91.6^\circ$ ,  $B''_{ka} = 2.963$  minutes.
6.  $B''_a = f_{ha} B''_{ka} = 195 \times 2.963 = 577.8$  minutes.

NOTE E: If  $B''_a$  were less than  $B_{Ba}$  [item (10) under Specifications], it would show that  $RT_a - CT_{Ma}$  is less than  $0.1^\circ$ . Steps 7—14, below, are analogous to steps 7—14 of problem II-A. If  $RT_a - CT_{Ma}$  were less than  $0.1^\circ$ , steps 7—14 would be replaced by steps 8—14 of problem II-B.

7.  $B_a = B''_a - B_{Ba} = 577.8 - 160 = 417.8$  minutes.
8.  $B_{ka} = \frac{B_a}{f_{ha}} = \frac{417.8}{195.0} = 2.142$ .
9. On chart 4; find, for  $B_{ka} = 2.142$  minutes,  $g_a = 13.9^\circ$ .
10.  $(m+g)_a = RT_a - CW = 245^\circ - 70^\circ = 175^\circ$ .
11. On chart 3; on curve for  $m+g = 130^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g_a = 13.9^\circ$ ,  $\left(\frac{f_{ha}}{U_a}\right)_{130} = 21.0$ ; on curve for  $m+g = 180^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g_a = 13.9^\circ$ ,  $\left(\frac{f_{ha}}{U_a}\right)_{180} = 23.5$ . Interpolating, find, for  $(m+g)_a = 175^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ,  $\frac{f_{ha}}{U_a} = 23.2$ .
12.  $U_a = f_{ha} \frac{U_a}{f_{ha}} = 195 \times \frac{1}{23.2} = 8.41$  minutes.
13. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_a = 245^\circ$  on scale A,  $F_{ia} = 1.93$  minutes.
14.  $F = \frac{U_a}{F_{ia}} = \frac{8.41}{1.93} = 4.4$  minutes.

NOTE F: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (160 minutes at  $245^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary for the divided

process prescribed by the conditions of this problem to give an equivalent sterilization value. This part of the problem is analogous to problem XIII-A (steps 3—32). If value of  $CT'_b$  were given as a condition of the problem instead of value of  $x'_b$  [item (6) under Specifications], the solution of problem XIII-C (steps 3—31) would be followed instead of that of problem XIII-A.

$$15. s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ.$$

$$16. I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ.$$

$$17. jI_1 = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ.$$

$$18. \text{On chart 4; find, for } jI_1 = 98.7^\circ, B''_{k1} = 2.994 \text{ minutes.}$$

NOTE G: Steps 19—21, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in item (6) under Specifications, the value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $g'_{b2}$  for  $g'$ ,  $x'_b$  for  $x'$ ,  $CT'_b$  for  $CT'$ , and  $B'_{kb1}$  for  $B'_k$ .

NOTE H: If it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for a different retort temperature, the value of  $f_h$  will be different from that of  $f_{ha}$ . In this problem,  $f_h = f_{ha}$ .

$$19. \frac{x'_b}{f_h} = \frac{80}{195} = 0.410 \text{ minute.}$$

$$20. B'_{kb1} = B''_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 2.994 - 0.410 = 2.584 \text{ minutes.}$$

$$21. \text{On chart 4; find, for } B'_{kb1} = 2.584 \text{ minutes, } g'_{b1} = 38.3^\circ.$$

$$22. g'_{b2} = g'_{b1} - s = 38.3^\circ - 10.0^\circ = 28.3^\circ.$$

$$23. (m+g)_1 = RT_1 - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ.$$

$$24. \text{Find } V \text{ by equation (17):}$$

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$

$$25. \text{On chart 5, on curve } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_1 = 180^\circ; \text{ find, for } g'_{b1} = 38.3^\circ, Y'_{220 \ b1} = 0.0000117.$$

$$26. \text{On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_1 = 250^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b1} = 46.4.$$

$$27. Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220 \ b1} = 46.4 \times 0.0000117 = 0.000543.$$

$$28. (m+g)_2 = RT_2 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ.$$

$$29. \text{On chart 5, interpolating for curve } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_2 = 170^\circ; \text{ find, for } g'_{b2} = 28.3^\circ, Y'_{220 \ b2} = 0.000049.$$

$$30. \text{On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_2 = 240^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b2} = 12.9.$$

$$31. Y'_{b2} = Z'_{b2} Y'_{220 \ b2} = 12.9 \times 0.000049 = 0.000632.$$

$$32. Y'_{b2} - Y'_{b1} = 0.000632 - 0.000543 = 0.000089.$$

$$33. \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = \frac{0.000089}{4.4} = 0.00002.$$

$$34. f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 195 \times 0.00002 = 0.0039.$$

$$35. V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 1.0000 + 0.0039 = 1.0039.$$

$$36. f = \frac{f_h}{V} = \frac{195}{1.0039} = 194.2.$$

37. On chart 2, on curve,  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_2=240^\circ$  on scale A,  $F_{z2}=3.61$  minutes.
38.  $U_2=FF_{z2}=4.4 \times 3.61=15.9$  minutes.
39.  $\frac{f}{U_2}=\frac{194.2}{15.9}=12.2$ .

NOTE I: On chart 3, it is seen that, when  $z=18^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below about 0.575 give a value of  $g$  that is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  be found less than  $0.1^\circ$ , the method of problem XIII-B (steps 28—40) should be followed from this point. Since  $g$  is greater than  $0.1^\circ$ , steps 40—44, below, are analogous to steps 28—32, problem XIII-A.

40. On chart 3, on curve for  $m+g=130^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U}=12.2$ ,  $g_{2\ 130}=10.55^\circ$ . Now, from curve for  $m+g=180^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U}=12.2$ ,  $g_{2\ 180}=10.05^\circ$ . Interpolating for  $(m+g)_2=170^\circ$ , obtain  $g_2=10.15^\circ$ .
41. Find  $x_c$  by means of equation (18):
- $$x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} \quad (18)$$
42.  $\text{Log } \frac{g'_{b2}}{g_2} = \log \frac{28.3}{10.15} = \log 2.78 = 0.444$ .
43.  $x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} = 195 \times 0.444 = 84.36$  minutes.
44.  $B_{B2} = x'_b + x_c = 80.00 + 84.36 = 164.36$  minutes = length of process. (See curves XIV-A, chart 8, sections A and A'.)

### PROBLEM XIV-B

Divided process. Calculation of a divided process equivalent to a given simple process at any retort temperature when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and
2. ( $RT_2 - CT_{M2}$ ) is less than  $0.1^\circ$  (see notes E and I).

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) First retort temperature.....( $RT_1=250^\circ$ )
- (4) Second retort temperature.....( $RT_2=240^\circ$ )
- (5) Temperature at center of can at time of change in retort temperature.....( $CT'_b=220^\circ$ )  
[The value of  $x'_b$  may be specified instead of  $CT'_b$  (see notes B and G)]
- (6) Initial temperature.....( $IT=150^\circ$ )
- (7) Cooling water temperature.....( $CW=70^\circ$ )
- (8)  $j=1.41$ .
- (9) Process necessary for sterilization at another retort temperature.....( $B_{Ba}=40$  minutes when  $RT_a=244^\circ$ )

Find process,  $B_{B_2}$ , necessary for sterilization with  $250^\circ$ — $240^\circ$  retort temperatures.

$B_{B_2} = x'_b + x_c < .1$ ;  $x_c < .1$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the point of change in retort temperature.

NOTE A: Since a value of  $z$  is not specified, one must be assumed (step 1). See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $x'_b$  were given instead of that of  $CT'_b$  [item (5) under Specifications]; the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note G.

NOTE C: If the given process [item (9) under Specifications] were a divided process, the method of solution would be that of problem XV-B.

Solution:

NOTE D: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—15).

1. Arbitrarily assume for slope of thermal death time curve:  $z = 18^\circ$ .
2. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
3. Interpolating for curve 1.3 on chart 1 gives  $f_h = 13$  minutes for No. 10 cans.
4.  $I_a = RT_a - IT = 244^\circ - 150^\circ = 94^\circ$ .
5.  $jI_a = 1.41 \times 94^\circ = 132.54^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI_a = 132.54^\circ$ ,  $B''_{ka} = 3.122$ .
7.  $B''_a = f_{ha} B''_{ka} = 13 \times 3.122 = 40.59$  minutes.

NOTE E: Since  $B''_a$  is greater than  $B_{Ba}$  [item (9) under Specifications], it is shown that  $RT_a - CT_{Ma}$  is greater than  $0.1^\circ$ . Thus, steps 8—15, below, are analogous to steps 7—14 of problem II-A. If  $RT_a - CT_{Ma}$  were less than  $0.1^\circ$  ( $B''_a < B_a$ ), steps 8—15 would be replaced by steps 8—14 of problem II-B. Our present problem presents a special case in which  $RT_a - CT_{Ma}$  is greater than  $0.1^\circ$  but  $RT_2 - CT_{M_2}$  (note I, below) is less than  $0.1^\circ$ .

8.  $B_a = B''_a - B_a = 40.59 - 40.00 = 0.59$  minute.
9.  $B_{ka} = \frac{B_a}{f_{ha}} = \frac{0.59}{13.0} = 0.045$  minute.
10. On chart 4; find, for  $B_{ka} = 0.045$  minute,  $g_a = 0.111^\circ$ .
11.  $(m+g)_a = RT_a - CW = 244^\circ - 70^\circ = 174^\circ$ .
12. On chart 3, on curve for  $m+g = 130^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g_a = 0.111^\circ$ ,  $\left(\frac{f_{ha}}{U_a}\right)_{130} = 0.592$ ; on curve for  $m+g = 180^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g_a = 0.111^\circ$ ,  $\left(\frac{f_{ha}}{U_a}\right)_{180} = 0.598$ . Interpolating, find, for  $(m+g)_a = 174^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ,  $\frac{f_{ha}}{U_a} = 0.597$ .
13.  $U_a = f_{ha} \frac{U_a}{f_{ha}} = 13 \times \frac{1}{0.597} = 21.78$  minutes.
14. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_a = 244^\circ$  on scale A,  $F_{ia} = 2.18$  minutes.
15.  $F = \frac{U_a}{F_{ia}} = \frac{21.78}{2.18} = 10.0$  minutes.



NOTE F: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (40 minutes at  $244^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary for the divided process prescribed by the conditions of this problem to give equivalent sterilization value. This part of the problem is analogous to problem XIII-D (steps 3—40). If value of  $x'_b$  were given as a condition of the problem instead of value  $CT'_b$  [item (5) under Specifications], the solution of problem XIII-B (steps 3—40) would be followed instead of that of problem XIII-D.

$$16. s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ.$$

$$17. I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 150^\circ = 100^\circ.$$

$$18. jI_1 = 1.41 \times 100^\circ = 141^\circ.$$

NOTE G: Steps 19—22, below, are in accordance with problem IV (steps 5—8). If, in item (5) under Specifications, the value of  $x'_b$  were given instead of that of  $CT'_b$ , these steps would be replaced by steps 6—8 of problem V, substituting  $g'_{b2}$  for  $g'$ ,  $x'_b$  for  $x'$ ,  $CT'_b$  for  $CT'$ , and  $B'_{kb1}$  for  $B'_k$ .

NOTE H: If it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for different retort temperature, the value of  $f_h$  will be different from that of  $f_{ha}$ . In this problem,  $f_h = f_{ha}$ .

$$19. g'_{b1} = RT_1 - CT'_b = 250^\circ - 220^\circ = 30^\circ.$$

$$20. \text{On chart 4; find, for } jI_1 = 141^\circ, B''_k = 3.148 \text{ minutes; and, for } g'_{b1} = 30^\circ, B'_{kb1} = 2.478 \text{ minutes.}$$

$$21. \frac{x'_b}{f_h} = B''_{k1} - B'_{kb1} = 3.148 - 2.478 = 0.67 \text{ minute.}$$

$$22. x'_b = f_h \frac{x'_b}{f_h} = 13 \times 0.67 = 8.7 \text{ minutes} = \text{time necessary to reach } 220^\circ.$$

$$23. g'_{b2} = g'_{b1} - s = 30^\circ - 10^\circ = 20^\circ.$$

$$24. (m+g)_1 = RT_1 - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ.$$

$$25. \text{Find } V \text{ by equation (17):}$$

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$

$$26. \text{On chart 5, on curve, } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_1 = 180^\circ; \text{ find, for } g'_{b1} = 30^\circ, Y'_{220 \ b1} = 0.000038.$$

$$27. \text{On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_1 = 250^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b1} = 46.4.$$

$$28. Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220 \ b1} = 46.4 \times 0.000038 = 0.00177.$$

$$29. (m+g)_2 = RT_2 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ.$$

$$30. \text{On chart 5, on curve, } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_2 = 170^\circ; \text{ find, for } g'_{b2} = 20^\circ, Y'_{220 \ b2} = 0.000198.$$

$$31. \text{On chart 2, on curve for } z = 18; \text{ find, for } RT_2 = 240^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b2} = 12.9.$$

$$32. Y'_{b2} = Z'_{b2} Y'_{220 \ b2} = 12.9 \times 0.000198 = 0.00255.$$

$$33. Y'_{b2} - Y'_{b1} = 0.00255 - 0.00177 = 0.00078.$$

$$34. \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = \frac{0.00078}{10.0} = 0.000078.$$

$$35. f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 13 \times 0.000078 = 0.00101.$$

$$36. V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 1.00000 + 0.00101 = 1.00101.$$

$$37. f = \frac{f_h}{V} = \frac{13.0}{1.00101} = 13.0 \text{ (approx.)}.$$

$$38. \text{ On chart 2, on curve, } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_2 = 240^\circ \text{ on scale A, } F_{i2} = 3.61 \text{ minutes.}$$

$$39. U_2 = FF_{i2} = 10 \times 3.61 = 36.1 \text{ minutes.}$$

$$40. \frac{f}{U_2} = \frac{13.0}{36.1} = 0.365.$$

NOTE I: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below about 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . The value of  $g_{2 < .1}$ , therefore, cannot be taken from curves of chart 3. Steps 41—53, below, are analogous to steps 28—40, problem XIII-D. If  $g$  were greater than  $0.1^\circ$ , we should continue from this point by method of problem XIII-C (steps 28—32).

$$41. \text{ Use equation (19):}$$

$$x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right) \right] \quad (19)$$

$$42. \text{ On chart 5, on curve } z = 18^\circ; \text{ find, for } g = 0.1^\circ, Y_{220 \cdot 2 \cdot 1} = 0.0353.$$

$$43. \text{ On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_2 = 240^\circ \text{ on scale B, } Z_{2 \cdot 1} = 12.9. \text{ (See step 31.)}$$

$$44. Y_{2 \cdot 1} = Z_{2 \cdot 1} Y_{220 \cdot 2 \cdot 1} = 12.9 \times 0.0353 = 0.4554.$$

$$45. \text{ On chart 6, on curve for } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_2 = 170^\circ; \text{ find, for } g = 0.1^\circ, \rho_{2 \cdot 1} = 0.946.$$

$$46. \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} = \frac{0.4554}{0.946} = 0.4814.$$

$$47. Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} = 0.00078 - 0.4814 = -0.4806. \text{ (} Y'_{b2} - Y'_{b1} \text{ is taken from step 33.)}$$

$$48. F_{i2} \left[ Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right] = 3.61 \times (-0.4806) = -1.735.$$

$$49. \text{ Taking } g'_{b2} \text{ from step 23, } \log g'_{b2} = \log 20 = 1.301.$$

$$50. 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left[ Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right] = 1 + 1.301 + (-1.735) = 1 + 1.301 - 1.735 = 0.566.$$

$$51. f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right) \right] = 13 \times 0.566 = 7.36 \text{ minutes.}$$

$$52. x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right) \right] = 36.10 + 7.36 = 43.46 \text{ minutes.}$$

$$53. B_{B2} = x'_{b2} + x_{c < .1} = 8.70 + 43.46 = 52.16 \text{ minutes} = \text{length of process. (See curves XIV-B, chart 8, sections B and B'.)}$$

## PROBLEM XV-A

Divided process. Calculation of a divided process equivalent to a given process at different retort temperatures when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and
2. ( $RT_2 - CT_{M2}$ ) is greater than 0.1 (see notes G and L).

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve [See note A].....( $z = 18^\circ$ )
- (4) First retort temperature.....( $RT_1 = 245^\circ$ )
- (5) Second retort temperature.....( $RT_2 = 240^\circ$ )
- (6) Number of minutes retort held at first retort temperature.....  
.....( $x'_b = 100$  minutes)  
[The value of  $CT'_b$  may be specified instead of  $x'_b$  (see notes B and J)]
- (7) Initial temperature.....( $IT = 180^\circ$ )
- (8) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (9)  $j = 1.41$ .
- (10) Process necessary for sterilization at other retort temperatures.....  
.....( $B_{B2a} = x_{ba} + x_{ca} = 80$  minutes + 149 minutes = 229 minutes;  
with  $RT_{1a} = 250^\circ$ , held for 80 [ $x'_{ba}$ ] minutes, then dropped to  $RT_{2a} = 242^\circ$ .)

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization with  $245^\circ$ — $240^\circ$  retort temperatures.  
 $B_{B2} = x'_b + x_c = 100 + x_c$ ;  $x_c$  being the number of minutes necessary to complete sterilization after the point of change in retort temperature.

NOTE A: If a value of  $z$  is not specified [item (3) under Specifications], one may be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (6) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in notes H and J.

NOTE C: If the given process [item (10) under Specifications] were a simple process, the method of solution would be that of problem XIV-A.

NOTE D: If the desired process were a simple process, items (5) and (6) under Specifications would be omitted and the latter part of solution would be changed as explained in note I.

Solution:

NOTE E: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—29).

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1, find  $f_h = 195$  minutes for No. 10 cans.
3.  $s_a = RT_{1a} - RT_{2a} = 250^\circ - 242^\circ = 8^\circ$ .
4.  $I_{1a} = RT_{1a} - IT = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ$ .
5.  $jI_{1a} = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI_{1a} = 98.7^\circ$ ,  $B''_{k1a} = 2.994$  minutes.

NOTE F: If the value of  $CT'_{ba}$  were given instead of that of  $x'_{ba}$  [item (10) under Specifications], steps 7—9, below, would be replaced by the single step:

$$6a. g'_{b1a} = RT_{1a} - CT'_{ba} = 250^\circ - CT'_{ba}$$

$$7. \frac{x'_{ba}}{f_{ha}} = \frac{80}{195} = 0.41 \text{ minute.}$$

$$8. B'_{kb1a} = B''_{k1a} - \frac{x'_{ba}}{f_{ha}} = 2.994 - 0.410 = 2.584 \text{ minutes.}$$

$$9. \text{ On chart 4; find, for } B'_{kb1a} = 2.584 \text{ minutes, } g'_{b1a} = 38.3^\circ.$$

$$10. g'_{b2a} = g'_{b1a} - s_a = 38.3^\circ - 8.0^\circ = 30.3^\circ.$$

$$11. \text{ Find } g_{2a} \text{ (by steps 12—15, below) using equation (20):}$$

$$g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} \right] \quad (20)$$

$$12. \frac{x_{ca}}{f_{ha}} = \frac{149}{195} = 0.764.$$

$$13. \text{ Log } g'_{b2a} = \log 30.3 = 1.481.$$

$$14. \text{ Log } g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_h} = 1.481 - 0.764 = 0.717.$$

$$15. g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_h} \right] = \log^{-1} 0.717 = 5.21^\circ.$$

NOTE G: Step 15 shows that  $g_{2a}$  is greater than  $0.1^\circ$ . If  $g_{2a}$  were less than  $0.1^\circ$ , the solution from this point would be according to the method of problem XV-B, steps 16—73.

$$16. (m+g)_{1a} = RT_{1a} - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ.$$

$$17. \text{ Find } F \text{ by equation (21):}$$

$$F = f_h \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} \right] \quad (21)$$

$$18. \text{ On chart 5, on curve, } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_{1a} = 180^\circ; \text{ find, for } g'_{b1a} = 38.3^\circ, \\ Y'_{220 \ b1a} = 0.0000117.$$

$$19. \text{ On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_{1a} = 250^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b1a} = 46.4.$$

$$20. Y'_{b1a} = Z'_{b1a} Y'_{220 \ b1a} = 46.4 \times 0.0000117 = 0.00054.$$

$$21. (m+g)_{2a} = RT_{2a} - CW = 242^\circ - 70^\circ = 172^\circ.$$

$$22. \text{ On chart 5, on curve, } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_{2a} = 172^\circ; \text{ find, for } \\ g'_{b2a} = 30.3^\circ, Y'_{220 \ b2a} = 0.000036; \text{ and, for } g_{2a} = 5.21^\circ, Y_{220 \ 2a} = 0.00372.$$

$$23. \text{ On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_{2a} = 242^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b2a} \\ (= Z_{2a}) = 16.7.$$

$$24. Y'_{b2a} = Z'_{b2a} Y'_{220 \ b2a} = 16.7 \times 0.000036 = 0.0006.$$

$$25. Y_{2a} = Z_{2a} Y_{220 \ 2a} = 16.7 \times 0.00372 = 0.062.$$

$$26. \text{ On chart 6, on curve for } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_{2a} = 172^\circ; \text{ find, for } \\ g_{2a} = 5.21^\circ, \rho_{2a} = 0.797.$$

$$27. \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} = \frac{0.062}{0.797} = 0.0778.$$

$$28. Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} = 0.00054 - 0.00060 + 0.07780 = 0.07774.$$

$$29. F = f_h \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} \right] = 195 \times 0.0777 = 15.15 \text{ minutes.}$$



NOTE H: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (80 minutes at  $250^\circ$  and 149 minutes at  $242^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with the divided process described by the conditions of this problem to give an equivalent process. This part of the problem (steps 30—59) is analogous to problem XIII-A (steps 3—31). If value of  $CT'_b$  were given as a condition of the problem instead of value of  $x'_b$  [item (6) under Specifications], the solution of problem XIII-C (steps 3—32) would be followed instead of that of problem XIII-A.

NOTE I: If the desired process were a simple process [i. e., items (5) and (6) under Specifications omitted], the solution would be completed by following the method given for problem I-A (steps 3—12).

$$30. s = RT_1 - RT_2 = 245^\circ - 240^\circ = 5^\circ.$$

$$31. I_1 = RT_1 - IT = 245^\circ - 180^\circ = 65^\circ.$$

$$32. jI_1 = 1.41 \times 65^\circ = 91.6^\circ.$$

$$33. \text{ On chart 4; find, for } jI_1 = 91.6^\circ, B''_{k1} = 2.963 \text{ minutes.}$$

NOTE J: Steps 34—36, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in item (6) under Specifications, the value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $g'_{b2}$  for  $g'$ ,  $x'_b$  for  $x'$ ,  $CT'_b$  for  $CT'$ , and  $B'_{kb1}$  for  $B'_k$ .

NOTE K: If it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for different retort temperature, the value of  $f_h$  will be different from that of  $f_{ha}$ . In this problem,  $f_h = f_{ha}$ .

$$34. \frac{x'_b}{f_h} = \frac{100}{195} = 0.513 \text{ minute.}$$

$$35. B'_{kb1} = B''_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 2.963 - 0.513 = 2.45 \text{ minutes.}$$

$$36. \text{ On chart 4; find, for } B'_{kb1} = 2.45 \text{ minutes, } g'_{b1} = 28.2^\circ.$$

$$37. g'_{b2} = g'_{b1} - s = 28.2^\circ - 5^\circ = 23.2^\circ.$$

$$38. (m+g)_1 = RT_1 - CW = 245^\circ - 70^\circ = 175^\circ.$$

$$39. \text{ Find } V \text{ by equation (17):}$$

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$

$$40. \text{ On chart 5, on curve, } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_1 = 175^\circ; \text{ find, for } g'_{b1} = 28.2^\circ, Y'_{220\ b1} = 0.000051.$$

$$41. \text{ On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_1 = 245^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b1} = 24.4.$$

$$42. Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220\ b1} = 24.4 \times 0.000051 = 0.00124.$$

$$43. (m+g)_2 = RT_2 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ.$$

$$44. \text{ On chart 5, interpolating for curve, } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_2 = 170^\circ; \text{ find, for } g'_{b2} = 23.2^\circ, Y'_{220\ b2} = 0.000113.$$

$$45. \text{ On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_2 = 240^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b2} = 12.9.$$

$$46. Y'_{b2} = Z'_{b2} Y'_{220\ b2} = 12.9 \times 0.000113 = 0.00146.$$

$$47. Y'_{b2} - Y'_{b1} = 0.00146 - 0.00124 = 0.00022.$$

$$48. \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = \frac{0.00022}{15.15} = 0.000015.$$

$$49. f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 195 \times 0.000015 = 0.0029.$$

50.  $V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 1.0000 + 0.0029 = 1.0029.$
51.  $f = \frac{f_h}{V} = \frac{195}{1.0029} = 194.4.$
52. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 240^\circ$  on scale A,  $F_{i2} = 3.61$  minutes.
53.  $U_2 = FF_{i2} = 15.15 \times 3.61 = 54.6$  minutes.
54.  $\frac{f}{U_2} = \frac{194.4}{54.6} = 3.56.$

NOTE L: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below about 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  were found less than  $0.1^\circ$ , the method of problem XIII-B (steps 28—40) would be followed from this point. Since  $g$  is greater than  $0.1^\circ$ , steps 55—59, below, are analogous to steps 28—32, problem XIII-A.

55. On chart 3, on curve for  $m + g = 130^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U_2} = 3.56$ ,  $g_{2\ 130} = 4.22^\circ$ ; and, on curve for  $m + g = 180^\circ$  and  $z = 18^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U_2} = 3.56$ ,  $g_{2\ 180} = 4.07^\circ$ . Interpolating for  $(m + g)_2 = 170^\circ$  and  $z = 18^\circ$ , find  $g_2 = 4.10^\circ$ .

56. Find  $x_c$  by equation (16):

$$x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} \tag{16}$$

57.  $\text{Log } \frac{g'_{b2}}{g_2} = \log \frac{23.2}{4.10} = \log 5.66 = 0.753.$

58.  $x_c = f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} = 195 \times 0.753 = 146.84$  minutes.

59.  $B_{B2} = x'_b + x_c = 100.00 + 146.84 = 246.84$  minutes = length of process. (See curves XV-A, chart 8, sections A and A'.)

### PROBLEM XV-B

Divided process. Calculation of a divided process equivalent to a given divided process at different retort temperatures when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and
2.  $(RT_2 - CT_{M2})$  is less than 0.1 (see notes G and L).

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (5) Second retort temperature.....( $RT_2 = 240^\circ$ )
- (6) Number of minutes retort held at first retort temperature...( $x'_b = 7$  minutes)  
[The value of  $CT'_b$  may be specified instead of  $x'_b$  (see notes B and J)]
- (7) Initial temperature.....( $IT = 150^\circ$ )
- (8) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (9)  $j = 1.41.$

- (10) Process necessary for sterilization at other retort temperatures.....  
 .....( $B_{B2a} = x'_{ba} + x_{ca} = 7$  minutes + 35 minutes = 42 minutes;  
 with  $RT_{1a} = 240^\circ$ , held for 7 [ $x'_{ba}$ ] minutes, then raised to  $RT_{2a} = 250^\circ$ .)

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization with  $250^\circ - 240^\circ$  retort temperatures.  
 $B_{B2} = x'_b + x_{c < .1} = 7 + x_{c < .1}$ ;  $x_{c < .1}$  being the number of minutes necessary  
 to complete sterilization after the point of change in retort temperature.

NOTE A: If a value of  $z$  is not specified [item (3) under Specifications], one may be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (6) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in notes H and J.

NOTE C: If the given process [item (10) under Specifications] were a simple process, the method of solution would be that of problem XIV-B.

NOTE D: If the desired process were a simple process, items (5) and (6) under Specifications would be omitted, and the latter part of solution would be changed as explained in note I.

Solution:

NOTE E: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—35).

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1, find  $f_h = 13$  minutes for No. 10 cans.
3.  $s_a = RT_{1a} - RT_{2a} = 240^\circ - 250^\circ = -10^\circ$ .
4.  $I_{1a} = RT_{1a} - IT = 240^\circ - 150^\circ = 90^\circ$ .
5.  $jI_{1a} = 1.41 \times 90^\circ = 126.9^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI_{1a} = 126.9^\circ$ ,  $B''_{k1a} = 3.103$  minutes.

NOTE F: If the value of  $CT'_{ba}$  were given instead of that of  $x'_{ba}$  [item (10) under Specifications], steps 7—9, below, would be replaced by the single step:

$$6a. \quad g'_{b1a} = RT_{1a} - CT'_{ba} = 240^\circ - CT'_{ba}$$

7.  $\frac{x'_{ba}}{f_h} = \frac{7}{13} = 0.538$  minute.
8.  $B'_{kb1a} = B''_{k1a} - \frac{x'_{ba}}{f_h} = 3.103 - 0.538 = 2.565$  minutes.
9. On chart 4; find, for  $B'_{kb1a} = 2.565$  minutes,  $g'_{b1a} = 36.8^\circ$ .
10.  $g'_{b2a} = g'_{b1a} - s_a = 36.8^\circ - (-10^\circ) = 36.8^\circ + 10^\circ = 46.8^\circ$ .
11. Find  $g_{2a}$  (by steps 12—15, below) using equation (20):
 
$$g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} \right] \quad (20)$$
12.  $\frac{x_{ca}}{f_{ha}} = \frac{35}{13} = 2.692$ .
13.  $\log g'_{b2a} = \log 46.8 = 1.67$ .
14.  $\log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} = 1.67 - 2.692 = -1.022$ .
15.  $g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_h} \right] = \log^{-1}(-1.022) = \log^{-1} 2.978 = 0.095$ .

NOTE G: Step 15 shows that  $g_{2a}$  is less than  $0.1^\circ$ . Thus, the symbol,  $g_{2 < .1a}$ , must be substituted for the symbol,  $g_{2a}$ . If  $g_{2a}$  were greater than  $0.1^\circ$ , the solution from this point would be according to the method of problem XV-A, steps 16—58.

$$16. (m+g)_{1a} = RT_{1a} - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ.$$

17. Find  $F$  by equation (22):

$$F = f_{ha} \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2 \ .1a}}{\rho_{2 \ .1a}} - \frac{\log g_{2 < .1a} + 1}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z}} \right] \quad (22)$$

$$18. \text{ On chart 5, on curve, } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_{1a} = 170^\circ; \text{ find, for } g'_{b1a} = 36.8^\circ, Y'_{220 \ b1a} = 0.000014.$$

$$19. \text{ On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_{1a} = 240^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b1a} = 12.9.$$

$$20. Y'_{b1a} = Z'_{b1a} Y'_{220 \ b1a} = 12.9 \times 0.000014 = 0.00018.$$

$$21. (m+g)_{2a} = RT_{2a} - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ.$$

$$22. \text{ On chart 5, on curve, } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_{2a} = 180^\circ; \text{ find, for } g'_{b2a} = 46.8^\circ, Y'_{220 \ b2a} = 0.0000042; \text{ and, for } g = 0.1^\circ, Y_{220 \ 2 \ .1a} = 0.0353.$$

$$23. \text{ On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_{2a} = 250^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b2a} (= Z'_{2 \ .1a}) = 46.4.$$

$$24. Y'_{b2a} = Z'_{b2a} Y'_{220 \ b2a} = 46.4 \times 0.0000042 = 0.00019.$$

$$25. Y_{2 \ .1a} = Z_{2 \ .1a} Y_{220 \ 2 \ .1a} = 46.4 \times 0.0353 = 1.63792.$$

$$26. \text{ On chart 6, on curve for } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_{2a} = 180^\circ; \text{ find, for } g = 0.1^\circ, \rho'_{2 \ .1a} = 0.9468.$$

$$27. \frac{Y_{2 \ .1a}}{\rho_{2 \ .1a}} = \frac{1.6379}{0.9468} = 1.72994.$$

$$28. Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2 \ .1a}}{\rho_{2 \ .1a}} = 0.00018 - 0.00019 + 1.72994 = 1.72993.$$

$$29. \text{ From step 15 and note G, } \log g_{2 < .1a} \left( = \log g'_{b2a} + \frac{x_{ca}}{f_h} \right) = -1.022.$$

$$30. \log g_{2 < .1a} + 1 = -1.022 + 1 = -0.022.$$

$$31. 250^\circ - RT_{2a} = 250^\circ - 250^\circ = 0^\circ.$$

$$32. \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z} = \frac{0}{18} = 0.$$

$$33. \log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z} = \log^{-1} 0 = 1.$$

$$34. Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2 \ .1a}}{\rho_{2 \ .1a}} - \frac{\log g_{2 < .1a} + 1}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z}} = 1.730 - \left[ \frac{-0.022}{1.0} \right] = 1.730 + 0.022 = 1.752.$$

$$35. F = f_{ha} \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2 \ .1a}}{\rho_{2 \ .1a}} - \frac{\log g_{2 < .1a} + 1}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z}} \right] \\ = 13 \times 1.752 = 22.78 \text{ minutes.}$$



NOTE H: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (7 minutes at  $240^\circ$  and 35 minutes at  $250^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with the divided process described by the conditions of this problem to give an equivalent process. This part of the problem (steps 36—73) is analogous to problem XIII-B (steps 3—40). If value of  $CT'_b$  were given as a condition of the problem instead of value of  $x'_b$  [item (6) under Specifications], the solution of problem XIII-D (steps 3—40) would be followed instead of that of problem XIII-B.

NOTE I: If the desired process were a simple process [i. e., items (5) and (6) under Specifications omitted], the solution would be completed by following the method given for problem I-B (steps 3—14).

$$36. s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ.$$

$$37. I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 150^\circ = 100^\circ.$$

$$38. jI_1 = 1.41 = 100^\circ = 141^\circ.$$

$$39. \text{On chart 4; find, for } jI_1 = 141^\circ, B''_{k1} = 3.148 \text{ minutes.}$$

NOTE J: Steps 40—42, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If, in item (6) under Specifications, the value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$ , these steps would be replaced by steps 5—8 of problem IV, substituting  $g'_{b2}$  for  $g'$ ,  $x'_b$  for  $x'$ ,  $CT'_b$  for  $CT'$ , and  $B'_{kb1}$  for  $B'_k$ .

NOTE K: In case it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for different retort temperature, the value of  $f_h$  will be different than that of  $f_{ha}$ . In this problem,  $f_h = f_{ha}$ .

$$40. \frac{x'_b}{f_h} = \frac{7}{13} = 0.538 \text{ minute.}$$

$$41. B'_{kb1} = B'_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 3.148 - 0.538 = 2.610 \text{ minutes.}$$

$$42. \text{On chart 4; find, for } B'_{kb1} = 2.610 \text{ minutes, } g'_{b1} = 41.0^\circ.$$

$$43. g'_{b2} = g'_{b1} - s = 41.0^\circ - 10.0^\circ = 31.0^\circ.$$

$$44. (m+g)_1 = RT_1 - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ.$$

$$45. \text{Find } V \text{ by equation (17):}$$

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$

$$46. \text{On chart 5, on curve, } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_1 = 180^\circ; \text{ find, for } g'_{b1} = 41.0^\circ, Y'_{220 \ b1} = 0.0000083.$$

$$47. \text{On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_1 = 250^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b1} = 46.4.$$

$$48. Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220 \ b1} = 46.4 \times 0.0000083 = 0.00039.$$

$$49. (m+g)_2 = RT_2 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ.$$

$$50. \text{On chart 5, on curve, } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_2 = 170^\circ; \text{ find, for } g'_{b2} = 31.0^\circ, Y'_{220 \ b2} = 0.0000314.$$

$$51. \text{On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_2 = 240^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b2} = 12.9.$$

$$52. Y'_{b2} = Z'_{b2} Y'_{220 \ b2} = 12.9 \times 0.0000314 = 0.00041.$$

$$53. Y'_{b2} - Y'_{b1} = 0.00041 - 0.00039 = 0.00002.$$

$$54. \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = \frac{0.00002}{22.78} = 0.00000088.$$

$$55. f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 13 \times 0.00000088 = 0.00001.$$

$$56. V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 1.00000 + 0.00001 = 1.00001.$$

$$57. f = \frac{f_h}{V} = \frac{13}{1.00001} = 13 \text{ (approx.)}.$$

58. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 240^\circ$  on scale A,  $F_{i2} = 3.61$  minutes.

$$59. U_2 = FF_{i2} = 22.78 \times 3.61 = 82.2 \text{ minutes.}$$

$$60. \frac{f}{U_2} = \frac{13.0}{82.2} = 0.158.$$

NOTE L: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . The value of  $g_{2 < .1}$ , therefore, cannot be taken from curves of chart 3. If  $g$  were greater than  $0.1^\circ$ , we should continue from this point by method of problem XIII-A (steps 28—32). Since  $g$  is less than  $0.1^\circ$ , steps 61—73, below, are analogous to steps 28—40, problem XIII-B.

61. Use equation (19):

$$x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right) \right] \quad (19)$$

62. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $Y_{220 \cdot 2 \cdot 1} = 0.0353$ .

63. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 240^\circ$  on scale B,  $Z_{2 \cdot 1} = 12.9$  (see step 51).

$$64. Y_{2 \cdot 1} = Z_{2 \cdot 1} Y_{220 \cdot 2 \cdot 1} = 12.9 \times 0.0353 = 0.4554.$$

65. On chart 6, on curve for  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_2 = 170^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{2 \cdot 1} = 0.9460$ .

$$66. \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} = \frac{0.4554}{0.9460} = 0.4814.$$

$$67. Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} = 0.00002 - 0.48140 = -0.4814.$$

( $Y'_{b2} - Y'_{b1}$  is taken from step 53.)

$$68. F_{i2} \left[ Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right] = 3.61 \times (-0.4814) = -1.730.$$

69. Taking  $g'_{b2}$  from step 43,  $\log g'_{b2} = \log 31.0 = 1.491$ .

$$70. 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right) = 1.000 + 1.491 + (-1.738) = 1.000 + 1.491 - 1.738 = 0.753.$$

$$71. f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right) \right] = 13 \times 0.753 = 9.79 \text{ minutes.}$$

$$72. x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 \cdot 1}}{\rho_{2 \cdot 1}} \right) \right] = 22.78 + 9.79 = 32.57 \text{ minutes.}$$

73.  $B_{B2} = x'_b + x_{c < .1} = 7.0 + 32.6 = 39.6$  minutes = length of process. (See curves XV-B, chart 8, sections B and B'.)

## PROBLEM XVI-A

Divided process. Calculation of effect of change in initial temperature upon time necessary for sterilization when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The time of occurrence of change in retort temperature is given [item (5) under Specifications]; and
3. ( $RT_2 - CT_{M2}$  is greater than  $0.1^\circ$  (see notes E and H).

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (4) Second retort temperature.....( $RT_2 = 242^\circ$ )
- (5) Number of minutes retort held at first retort temperature.....  
.....( $x'_b = 80$  minutes)  
[The value of  $CT'_b$  may be specified instead of  $x'_b$  (see note A)]
- (6) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (7)  $j = 1.41$ .
- (8) Process necessary for sterilization at another initial temperature.....  
.....( $B_{B2a} = 229$  minutes when  $IT_a = 180^\circ$ )

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $160^\circ$ .

NOTE A: Since a value of  $z$  is not specified, one must be assumed. See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (5) under Specifications], the problem would be solved by the method of problem XVI-C.

NOTE C: If the process were a simple process, the problem would be solved by the method of problem III.

Solution:

NOTE D: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—30).

1. Assume value for  $z$  ( $z = 18^\circ$ ); and for temperature of cooling water ( $CW = 70^\circ$ ).
2. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
3. Interpolating for curve 19.5 on chart 1, find  $f_h = 195$  minutes for No. 10 cans.
4.  $s_a = RT_{1a} - RT_{2a} = 250^\circ - 242^\circ = 8^\circ$ .
5.  $I_{1a} = RT_{1a} - IT_a = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ$ .
6.  $jI_{1a} = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ$ .
7. On chart 4; find, for  $jI_{1a} = 98.7^\circ$ ,  $B''_{k1a} = 2.994$  minutes.
8.  $\frac{x'_{ba}}{f_{ha}} = \frac{80}{195} = 0.41$  minute.
9.  $B'_{kb1a} = B''_{k1a} - \frac{x'_{ba}}{f_{ha}} = 2.994 - 0.410 = 2.584$  minutes.

10. On chart 4; find, for  $B'_{kb1a} = 2.584$  minutes,  $g'_{b1a} = 38.3^\circ$ .

11.  $g'_{b2a} = g'_{b1a} - s_a = 38.3^\circ - 8.0^\circ = 30.3^\circ$ .

12. Find  $g_{2a}$  (by steps 13—16, below) using equation (20):

$$g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} \right] \quad (20)$$

13.  $\frac{x_{ca}}{f_{ha}} = \frac{149}{195} = 0.764$ . ( $x_{ca} = B_{B2a} - x'_{ba}$ )

14.  $\log g'_{b2a} = \log 30.3 = 1.481$ .

15.  $\log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} = 1.481 - 0.764 = 0.717$ .

16.  $g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} \right] = \log^{-1} 0.717 = 5.21^\circ$ .

NOTE E: Step 16 shows that  $g_{2a}$  is greater than  $0.1^\circ$ . If  $g_{2a}$  were less than  $0.1^\circ$ , the solution from this point would be according to the method of problem XVI-B, steps 17—75.

17.  $(m+g)_{1a} = RT_{1a} - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$ .

18. Find  $F$  by equation (21):

$$F = f_{ha} \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} \right] \quad (21)$$

19. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_{1a} = 180^\circ$ ; find, for  $g'_{b1a} = 38.3^\circ$ ,  $Y'_{220\ b1a} = 0.0000117$ .

20. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_{1a} = 250^\circ$  on scale B,  $Z'_{b1a} = 46.4$ .

21.  $Y'_{b1a} = Z'_{b1a} Y'_{220\ b1a} = 46.4 \times 0.0000117 = 0.00054$ .

22.  $(m+g)_{2a} = RT_{2a} - CW = 242^\circ - 70^\circ = 172^\circ$ .

23. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_{2a} = 172^\circ$ ; find, for  $g'_{b2a} = 30.3^\circ$ ,  $Y'_{220\ b2a} = 0.000036$ ; and, for  $g_{2a} = 5.21^\circ$ ,  $Y_{220\ a} = 0.00372$ .

24. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_{2a} = 242^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2a}$  ( $= Z_{2a}$ ) = 16.7.

25.  $Y'_{b2a} = Z'_{b2a} Y'_{220\ b2a} = 16.7 \times 0.000036 = 0.0006$ .

26.  $Y_{2a} = Z_{2a} Y_{220\ 2a} = 16.7 \times 0.00372 = 0.062$ .

27. On chart 6, on curve for  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_{2a} = 172^\circ$ ; find, for  $g_{2a} = 5.21^\circ$ ,  $\rho_{2a} = 0.797$ .

28.  $\frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} = \frac{0.062}{0.797} = 0.0778$ .

29.  $Y'_{b1a} - Y'_{b2a} - \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} = 0.00054 - 0.00060 + 0.07780 = 0.0777$ .

30.  $F = f_h \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} - \frac{Y_{2a}}{\rho_{2a}} \right] = 195 \times 0.0777 = 15.15$  minutes.

NOTE F: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (with  $IT_a = 180^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with initial temperature of  $160^\circ$  to give an equivalent process. This part of the solution (steps 31—60) is analogous to the solution of problem XIII-A (steps 3—32).



31.  $s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 242^\circ = 8^\circ$ .  
 32.  $I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 160^\circ = 90^\circ$ .  
 33.  $jI_1 = 1.41 \times 90^\circ = 126.9^\circ$ .  
 34. On chart 4; find, for  $jI_1 = 126.9^\circ$ ,  $B''_{k1} = 3.103$  minutes.

NOTE G: If it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for different initial temperature, the value of  $f_h$  will be different than that of  $f_{ha}$ . In this problem,  $f_h = f_{ha}$ .

35.  $\frac{x'_b}{f_h} = \frac{80}{195} = 0.41$  minute (see step 8).  
 36.  $B'_{kb1} = B''_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 3.103 - 0.410 = 2.693$  minutes.  
 37. On chart 4; find, for  $B'_{kb1} = 2.693$  minutes,  $g'_{b1} = 49.3^\circ$ .  
 38.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 49.3^\circ - 8.0^\circ = 41.3^\circ$ .  
 39.  $(m+g)_1 = RT_1 - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$  (see step 17).  
 40. Find  $V$  by equation (17):  

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$
  
 41. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_1 = 180^\circ$ ; find, for  $g'_{b1} = 49.3^\circ$ ,  $Y'_{220\ b1} = 0.000003$ .  
 42. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_1 = 250^\circ$  on scale B,  $Z'_{b1} = 46.4$  (see step 20).  
 43.  $Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220\ b1} = 46.4 \times 0.000003 = 0.00014$ .  
 44.  $(m+g)_2 = RT_2 - CW = 242^\circ - 70^\circ = 172^\circ$  (see step 22).  
 45. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_2 = 172^\circ$ ; find, for  $g'_{b2} = 41.3^\circ$ ,  $Y'_{220\ b2} = 0.0000082$ .  
 46. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 242^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2} = 16.7$ .  
 47.  $Y'_{b2} = Z'_{b2} Y'_{220\ b2} = 16.7 \times 0.0000082 = 0.00014$ .  
 48.  $Y'_{b2} - Y'_{b1} = 0.00014 - 0.00014 = 0$ .  
 49.  $\frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = \frac{0}{15.15} = 0$ .  
 50.  $f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 195 \times 0 = 0$ .  
 51.  $V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} = 1 + 0 = 1$ .  
 52.  $f = \frac{f_h}{V} = \frac{195}{1} = 195$ .  
 53. On chart 2, on curve,  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 242^\circ$  on scale A,  $F_{i2} = 2.77$  minutes.  
 54.  $U_2 = FF_{i2} = 15.15 \times 2.77 = 41.9$  minutes.  
 55.  $\frac{f}{U_2} = \frac{195}{41.9} = 4.65$ .

NOTE H: On chart 3, it is seen that, when  $z = 18^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below about 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  were found less than  $0.1^\circ$ , the method of problem XIII-B (steps 28—40) would be followed from this point. Since  $g$  is greater than  $0.1^\circ$ , steps 56—60, below, are analogous to steps 28—32, problem XIII-A.

56. On chart 3, on curve for  $m+g=130^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U_2}=4.65$ ,  $g_{2\ 130}=5.44^\circ$ ; and, on curve for  $m+g=180^\circ$  and  $z=18^\circ$ ; find, for  $\frac{f}{U_2}=4.65$ ,  $g_{2\ 180}=5.18^\circ$ . Interpolating for  $(m+g)_2=170^\circ$  and  $z=18^\circ$ , find  $g_2=5.22^\circ$ .
57. Find  $x_c$  by equation (18):
- $$x_c=f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} \tag{18}$$
58.  $\text{Log } \frac{g'_{b2}}{g_2} = \text{log } \frac{41.3}{5.22} = \text{log } 7.912 = 0.899$ .
59.  $x_c=f_h \log \frac{g'_{b2}}{g_2} = 195 \times 0.899 = 175.3$ .
60.  $B_{B2}=x'_b+x_c=80.0+175.3=255.3$  minutes=length of process. (See curves XVI-A, chart 8, sections A and A'.)

PROBLEM XVI-B

Divided process. Calculation of effect of change in initial temperature upon time necessary for sterilization when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The time of occurrence of change in retort temperature is given [item (5) under Specifications]; and
3.  $(RT_2-CT_{M2})$  is less than  $0.1^\circ$  (see notes E and H).

Specifications:

- (1) Product.....

(2) Size of can.....

(3) First retort temperature.....

(4) Second retort temperature.....

(5) Number of minutes retort held at first retort temperature....

(6) Initial temperature.....

(7)  $j=1.41$ .

(8) Process necessary for sterilization at another initial temperature.....
- (Peas)

(No. 10)

$(RT_1=240^\circ)$

$(RT_2=250^\circ)$

$(x'_b=7\text{ minutes})$

$(IT=180^\circ)$

$(B_{B2a}=42\text{ minutes when } IT_a=150^\circ)$

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $180^\circ$ .

NOTE A: Since a value of  $z$  is not specified, one must be assumed (step 1). See paragraph 8 of Introduction for the effect of variation in the value of  $z$  upon the result.

NOTE B: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (5) under Specifications], the problem would be solved by the method of problem XVI-C.

NOTE C: If the process were a simple process, the problem would be solved by the method of problem III.

Solution:

NOTE D: The object is first to find the value of  $F$  (steps 1—37).

1. Assume value for  $z$  ( $z = 18^\circ$ ); and for temperature of cooling water ( $CW = 70^\circ$ ).
2. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
3. Interpolating for curve, 1.3, on chart 1, find,  $f_h = 13$  minutes for No. 10 cans.
4.  $s_a = RT_{1a} - RT_{2a} = 240^\circ - 250^\circ = -10^\circ$ .
5.  $I_{1a} = RT_{1a} - IT_a = 240^\circ - 150^\circ = 90^\circ$ .
6.  $jI_{1a} = 1.41 \times 90^\circ = 126.9^\circ$ .
7. On chart 4; find, for  $jI_{1a} = 126.9^\circ$ ,  $B''_{k1a} = 3.103$  minutes.
8.  $\frac{x'_{ba}}{f_{ha}} = \frac{7}{13} = 0.538$  minute.
9.  $B'_{kb1a} = B''_{k1a} - \frac{x'_{ba}}{f_{ha}} = 3.103 - 0.538 = 2.565$ .
10. On chart 4; find, for  $B'_{kb1a} = 2.565$  minutes,  $g'_{b1a} = 36.8^\circ$ .
11.  $g'_{b2a} = g'_{b1a} - s_a = 36.8^\circ - (-10^\circ) = 36.8^\circ + 10.0^\circ = 46.8^\circ$ .
12. Find  $g_{2a}$  (by steps 13—17, below) using equation (20):

$$g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} \right] \quad (20)$$

13.  $x_{ca} = B_{B2a} - x'_{ba} = 42 - 7 = 35$  minutes.
14.  $\frac{x_{ca}}{f_{ha}} = \frac{35}{13} = 2.692$ .
15.  $\log g'_{b2a} = \log 46.8 = 1.67$ .
16.  $\log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} = 1.67 - 2.692 = -1.022$ .
17.  $g_{2a} = \log^{-1} \left[ \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} \right] = \log^{-1}(-1.022) = \log^{-1} 2.978 = 0.095$ .

NOTE E: Step 17 shows that  $g_{2a}$  is less than  $0.1^\circ$ . Thus, the symbol,  $g_{2 < .1a}$ , must be substituted for the symbol,  $g_{2a}$ . If  $g_{2a}$  were greater than  $0.1^\circ$ , the solution from this point would be according to the method of problem XVI-A, steps 17—60.

18.  $(m+g)_{1a} = RT_{1a} - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ$ .
19. Find  $F$  by equation (22):

$$F = f_{ha} \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2 \ .1a}}{\rho_{2 \ .1a}} - \frac{\log g_{2 < .1a} + 1}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z}} \right] \quad (22)$$

20. On chart 5, on curve  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_{1a} = 170^\circ$ ; find, for  $g'_{b1a} = 36.8^\circ$ ,  $Y'_{220 \ b1a} = 0.000014$ .
21. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_{1a} = 240^\circ$  on scale B,  $Z'_{b1a} = 12.9$ .
22.  $Y'_{b1a} = Z'_{b1a} Y'_{220 \ b1a} = 12.9 \times 0.000014 = 0.00018$ .
23.  $(m+g)_{2a} = RT_{2a} - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$ .
24. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_{2a} = 180^\circ$ ; find, for  $g'_{b2a} = 46.8^\circ$ ,  $Y'_{220 \ b2a} = 0.0000042$ ; and, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $Y_{220 \ 2 \ .1a} = 0.0353$ .
25. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_{2a} = 250^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2a} (= Z_{2 \ .1a}) = 46.4$ .
26.  $Y'_{b2a} = Z'_{b2a} Y'_{220 \ b2a} = 46.4 \times 0.0000042 = 0.00019$ .
27.  $Y_{2 \ .1a} = Z_{2 \ .1a} Y_{220 \ 2 \ .1a} = 46.4 \times 0.0353 = 1.63792$ .
28. On chart 6, on curve for  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_{2a} = 180^\circ$ ; find, for  $g = 0.1^\circ$ ,  $\rho_{2 \ .1a} = 0.9468$ .

$$29. \frac{Y_{2.1a}}{\rho_{2.1a}} = \frac{1.6379}{0.9468} = 1.72994.$$

$$30. Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2.1a}}{\rho_{2.1a}} = 0.00018 - 0.00019 + 1.72994 = 1.72993.$$

$$31. \text{From step 17 and note E, } \log g_{2<.1a} \left( = \log g'_{b2a} - \frac{x_{ca}}{f_{ha}} \right) = -1.022.$$

$$32. \log g_{2<.1a} + 1 = -1.022 + 1.000 = -0.022.$$

$$33. 250^\circ - RT_{2a} = 250^\circ - 250^\circ = 0^\circ.$$

$$34. \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z} = \frac{0}{18} = 0.$$

$$35. \log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z} = \log^{-1} 0 = 1.$$

$$36. Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2.1a}}{\rho_{2.1a}} - \frac{\log g_{2<.1a} + 1}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z}} = 1.730 - \left[ \frac{-0.022}{1.0} \right] = 1.730 + 0.022 = 1.752.$$

$$37. F = f_h \left[ Y'_{b1a} - Y'_{b2a} + \frac{Y_{2.1a}}{\rho_{2.1a}} - \frac{\log g_{2<.1a} + 1}{\log^{-1} \frac{250^\circ - RT_{2a}}{z}} \right] = 13 \times 1.752 = 22.78 \text{ minutes.}$$

NOTE F: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (with  $IT_a = 150^\circ$ ) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with initial temperature of  $180^\circ$  to give an equivalent process. This part of the solution (steps 38—75) is analogous to the solution of problem XIII-B (steps 3—40).

$$38. s = RT_1 - RT_2 = 240^\circ - 250^\circ = -10^\circ \text{ (see step 4).}$$

$$39. I_1 = RT_1 - IT = 240^\circ - 180^\circ = 60^\circ.$$

$$40. jI_1 = 1.41 \times 60^\circ = 84.6^\circ.$$

$$41. \text{On chart 4; find, for } jI_1 = 84.6^\circ, B'_{k1} = 2.925 \text{ minutes.}$$

NOTE G: If it is desired to calculate an equivalent process for a different size of can, as well as for different initial temperature, the value of  $f_h$  will be different than that of  $f_{ha}$ . In this problem,  $f_h = f_{ha}$ .

$$42. \frac{x'_b}{f_h} = \frac{7}{13} = 0.538 \text{ (see step 8).}$$

$$43. B'_{kb1} = B'_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 2.925 - 0.538 = 2.387 \text{ minutes.}$$

$$44. \text{On chart 4; find, for } B'_{kb1} = 2.387 \text{ minutes, } g'_{b1} = 24.3^\circ.$$

$$45. g'_{b2} = g'_{b1} - s = 24.3^\circ - (-10^\circ) = 24.3^\circ + 10^\circ = 34.3^\circ.$$

$$46. (m+g)_1 = RT_1 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ.$$

$$47. \text{Find } V \text{ by equation (17):}$$

$$V = 1 + f_h \frac{Y'_{b2} - Y'_{b1}}{F} \quad (17)$$

$$48. \text{On chart 5, on curve, } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_1 = 170^\circ; \text{ find, for } g'_{b1} = 24.3^\circ, Y'_{220\ b1} = 0.000095.$$

$$49. \text{On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_1 = 240^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b1} = 12.9.$$

$$50. Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220\ b1} = 12.9 \times 0.000095 = 0.00123.$$

$$51. (m+g)_2 = RT_2 - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ.$$

$$52. \text{On chart 5, on curve, } z = 18^\circ \text{ and } (m+g)_2 = 180^\circ; \text{ find, for } g'_{b2} = 34.3^\circ, Y'_{220\ b2} = 0.0000202.$$



53. On chart 2, on curve for  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_2=250^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2}=46.4$ .
54.  $Y'_{b2}=Z'_{b2}Y'_{220\ b2}=46.4 \times 0.0000202=0.00102$ .
55.  $Y'_{b2}-Y'_{b1}=0.00123-0.00102=-0.00021$ .
56.  $\frac{Y'_{b2}-Y'_{b1}}{F}=\frac{-0.00021}{22.78}=-0.0000092$ .
57.  $\frac{f_h Y'_{b2}-Y'_{b1}}{F}=13 \times (-0.0000092)=-0.00012$ .
58.  $V=1+f_h \frac{Y'_{b2}-Y'_{b1}}{F}=1+(-0.00012)=1-0.00012=0.99988$ .
59.  $f=\frac{f_h}{V}=\frac{13}{0.99988}=13$  (approx.).
60. On chart 2, on curve,  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_2=250^\circ$  on scale A,  $F_{i2}=1.00$  minute.
61.  $U_2=FF_{i2}=22.78 \times 1.00=22.78$  minutes.
62.  $\frac{f}{U_2}=\frac{13}{22.78}=0.5707$ .

NOTE H: On chart 3, it is seen that, when  $z=18^\circ$ , all values of  $\frac{f}{U_2}$  below approximately 0.575 give a value of  $g$  which is less than  $0.1^\circ$ . If  $g$  be found greater than  $0.1^\circ$ , the method of problem XIII-A (steps 28—32) should be followed from this point. Since  $g$  is less than  $0.1^\circ$ , steps 63—75, below, are analogous to steps 28—40, problem XIII-B.

63. Use equation (19):

$$x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}} \right) \right] \quad (19)$$

64. On chart 5, on curve,  $z=18^\circ$ ; find, for  $g=0.1^\circ$ ,  $Y_{220\ 2\ .1}=0.0353$ .
65. On chart 2, on curve for  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_2=250^\circ$  on scale B,  $Z_{2\ .1}=46.4$  (see step 53).
66.  $Y_{2\ .1}=Z_{2\ .1}Y_{220\ 2\ .1}=46.4 \times 0.0353=1.63792$  (see step 27).
67. On chart 6, on curve,  $z=18^\circ$  and  $(m+g)_2=180^\circ$ ; find, for  $g=0.1^\circ$ ,  $\rho_{2\ .1}=0.9468$  (see step 28).
68.  $\frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}}=\frac{1.63792}{0.9468}=1.72995$  (see step 29).
69.  $Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}}=-0.00021-1.72995=-1.73016$ .  
( $Y_b-Y_{b1}$  is taken from step 55).
70.  $F_{i2} \left( Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}} \right)=1.00 \times (-1.730)=-1.730$ .
71. Taking  $g'_{b2}$  from step 45,  $\log g'_{b2}=\log 34.3^\circ=1.535$ .
72.  $1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}} \right)=1+1.535+(-1.730)=$   
 $1.000+1.535-1.730=0.805$ .
73.  $f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}} \right) \right]=13 \times 0.805=10.47$  minutes.
74.  $x_{c < .1} = U_2 + f_h \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{i2} \left( Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_{2\ .1}}{\rho_{2\ .1}} \right) \right]=22.78+10.47$   
 $=33.25$  minutes.
75.  $B_{B2}=x'_b+x_{c < .1}=7.0+33.3=40.3$  minutes=length of process. (See curves XVI-B, chart 8, sections B and B'.)

## PROBLEM XVI-C

Divided process. Calculation of effect of change in initial temperature upon time necessary for sterilization when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The temperature at center of can at time of change in retort temperature is given [item (5) under Specifications];
3.  $(RT_2 - CT_{M2})$  has any value.

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) First retort temperature.....( $RT_1 = 240^\circ$ )
- (4) Second retort temperature.....( $RT_2 = 250^\circ$ )
- (5) Temperature at center of can at time of change in retort temperature....  
.....( $CT'_b = 220^\circ$ )
- (6) Initial temperature.....( $IT = 180^\circ$ )
- (7)  $j = 1.41$ .
- (8) Process necessary for sterilization with another initial temperature.....  
.....( $B_{B2a} = 42$  minutes when  $IT_a = 150^\circ$ )

Find process,  $B_{B2}$ , necessary for sterilization when initial temperature is  $180^\circ$ .

NOTE A: If value of  $x'_b$  were given instead of that of  $CT'_b$  [item (5) under Specifications], the problem would be solved by the method either of problem XVI-A (if  $RT_2 - CT_{M2}$  were greater than  $0.1^\circ$ ) or of problem XVI-B (if  $RT_2 - CT_{M2}$  were less than  $0.1^\circ$ ).

NOTE B: The method of solving this problem is like that of problem III, which applies to the simple process.

Solution:

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1, find  $f_h = 13$  minutes for No. 10 cans.
3.  $I_1 = RT_1 - IT = 240^\circ - 180^\circ = 60^\circ$ .
4.  $I_{1a} = RT_{1a} - IT_a = 240^\circ - 150^\circ = 90^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $I_1 = 60^\circ$ ,  $B''_{k01} = 2.777$  minutes; and, for  $I_{1a} = 90^\circ$ ,  $B''_{k01a} = 2.954$  minutes.
6.  $B''_{k01} - B''_{k01a} = 2.777 - 2.954 = -0.177$  minute.
7.  $f_h(B''_{k01} - B''_{k01a}) = 13 \times (-0.177) = -2.3$  minutes, which must be added to the process.
8.  $B_{B2} = B_{B2a} + f_h(B''_{k01} - B''_{k01a}) = 42.0 + (-2.3) = 42.0 - 2.3 = 39.7$  minutes = length of process when initial temperature is  $180^\circ$ . (See curves XVI-C, chart 8, sections B and  $B'$ .)

# PROBLEM XVII-A

Divided process. Calculation of temperature attained in center of can in a given length of time when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The temperature at center of can at time of change in retort temperature is given [item (5) under Specifications]; and
3.  $(RT_1 - CT'_1)$  and  $(RT_2 - CT'_2)$  have any values.

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (4) Second retort temperature.....( $RT_2 = 240^\circ$ )
- (5) Temperature at center of can at time of change.....( $CT'_b = 236^\circ$ )
- (6) Initial temperature.....( $IT = 180^\circ$ )
- (7)  $j = 1.41$ .

Find the temperature at center of can:

- $(CT'_1)$ —25 minutes ( $x'_1$ ) after the beginning of the process, and
- $(CT'_2)$ —60 minutes ( $x'_2$ ) after the beginning of the process.

NOTE A: If value of  $x'_b$  were given instead of that of  $CT'_b$  [item (5) under Specifications] the methods of solution of problem XVII-B would be followed.

Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1, find  $f_h = 62$  for No. 2 cans.
3.  $I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ$ .
4.  $jI_1 = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ$ .
5.  $g'_{b1} = RT_1 - CT'_b = 250^\circ - 236^\circ = 14^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI_1 = 98.7^\circ$ ,  $B''_{k1} = 2.994$  minutes; and, for  $g'_{b1} = 14^\circ$ ,  $B'_{kb1} = 2.148$  minutes.
7.  $B''_{k1} - B'_{kb1} = 2.994 - 2.148 = 0.846$  minute.
8.  $x'_b = f_h(B''_{k1} - B'_{kb1}) = 62 \times 0.846 = 52.5$  minutes.

NOTE B: Since  $x'_1$  (25 minutes) is less than  $x'_b$  (52.5 minutes) the first point to be determined ( $CT'_1$ ) falls before the change in retort temperature; and, since  $x'_2$  (60 minutes) is greater than  $x'_b$ , the second point ( $CT'_2$ ) falls after the change.

$CT'_1$ :

9.  $\frac{x'_1}{f_h} = \frac{25}{62} = 0.403$  minute.
10.  $B'_{k1} = B''_{k1} - \frac{x'_1}{f_h} = 2.994 - 0.403 = 2.591$  minutes.
11. On chart 4; find, for  $B'_{k1} = 2.591$  minutes,  $g'_1 = 39.2^\circ$ .
12.  $CT'_1 = RT_1 - g'_1 = 250^\circ - 39.2^\circ = 210.8^\circ =$  temperature of can at 25 minutes.  
(See curves XVII-A ( $CT'_1$ ), chart 8, sections A and A'.)

$CT'_2$ :

13.  $x'_2 - x'_b = 60 - 52.5 = 7.5$  minutes.
14.  $\frac{x'_2 - x'_b}{f_h} = \frac{7.5}{62} = 0.121$  minute.
15.  $s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ$ .
16.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 14^\circ - 10^\circ = 4^\circ$ .
17. On chart 4; find, for  $g'_{b2} = 4^\circ$ ,  $B'_{kb2} = 1.60$  minutes.
18.  $B'_{k2} = B'_{kb2} - \frac{x'_2 - x'_b}{f_h} = 1.600 - 0.121 = 1.479$  minutes.

NOTE C: If  $B'_{k2}$  were found to be negative, it would show that  $RT_2 - CT'_2$  is less than  $0.1^\circ$ , so that (within one-tenth of a degree)  $CT'_2 = RT_2 = 240^\circ$ .

19. On chart 4; find, for  $B'_{k2} = 1.479$  minutes,  $g'_2 = 3.01^\circ$ .
20.  $CT'_2 = RT_2 - g'_2 = 240.00^\circ - 3.01^\circ = 236.99^\circ =$  temperature of can at 60 minutes. (See curves XVII-A ( $CT'_2$ ), chart 8, sections A and A'.)

### PROBLEM XVII-B

Divided process. Calculation of temperature attained in center of can in a given length of time when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The time of occurrence of change in retort temperature is given [item (5) under Specifications]; and
3.  $(RT_1 - CT'_1)$  and  $(RT_2 - CT'_2)$  have any values.

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (4) Second retort temperature.....( $RT_2 = 240^\circ$ )
- (5) Number of minutes retort held at first retort temperature....( $x'_b = 4$  minutes)
- (6) Initial temperature.....( $IT = 170^\circ$ )
- (7)  $j = 1.41$ .



Find the temperature at center of can:

( $CT'_1$ )—3 minutes ( $x'_1$ ) after the beginning of the process, and

( $CT'_2$ )—11 minutes ( $x'_2$ ) after the beginning of the process.

NOTE A: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (5) under Specifications], the methods of solution of problem XVII-A would be followed.

Solutions:

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1, find  $f_h = 4.2$  for No. 2 cans.
3.  $I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 170^\circ = 80^\circ$ .
4.  $jI_1 = 1.41 \times 80^\circ = 112.8^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $jI_1 = 112.8^\circ$ ,  $B''_{k1} = 3.063$  minutes.
6.  $\frac{x'_b}{f_h} = \frac{4.0}{4.2} = 0.952$  minute.
7.  $B'_{kb1} = B''_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 3.063 - 0.952 = 2.111$  minutes.
8. On chart 4; find, for  $B'_{kb1} = 2.111$  minutes,  $g'_{b1} = 12.85^\circ$ .
9.  $CT'_b = RT_1 - g'_{b1} = 250.00^\circ - 12.85^\circ = 237.15^\circ$ .

NOTE B: Since  $x'_1$  (3 minutes) is less than  $x'_b$  (4 minutes), the first point to be determined ( $CT'_1$ ) falls before the change in retort temperature; and, since  $x'_2$  (11 minutes) is greater than  $x'_b$ , the second point ( $CT'_2$ ) falls after the change.

$CT'_1$ :

10.  $\frac{x'_1}{f_h} = \frac{3.0}{4.2} = 0.714$  minute.
11.  $B'_{k1} = B''_{k1} - \frac{x'_1}{f_h} = 3.063 - 0.714 = 2.349$  minutes.
12. On chart 4; find, for  $B'_{k1} = 2.349$  minutes,  $g'_1 = 22.3^\circ$ .
13.  $CT'_1 = RT_1 - g'_1 = 250.0^\circ - 22.3^\circ = 227.7^\circ =$  temperature of can at 3 minutes.  
(See curves XVII-B ( $CT'_1$ ), chart 8, sections B and B'.)

$CT'_2$ :

14.  $x'_2 - x'_b = 11 - 4 = 7$  minutes.
15.  $\frac{x'_2 - x'_b}{f_h} = \frac{7.0}{4.2} = 1.667$  minutes.
16.  $s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ$ .
17.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 12.85^\circ - 10.00^\circ = 2.85^\circ$ .
18. On chart 4; find, for  $g'_{b2} = 2.85^\circ$ ,  $B'_{kb2} = 1.453$  minutes.
19.  $B'_{k2} = B'_{kb2} - \frac{x'_2 - x'_b}{f_h} = 1.453 - 1.667 = -0.214$  minute.

NOTE C: Since  $B'_{k2}$  is negative,  $RT - CT'_2$  is shown to be less than  $0.1^\circ$ . Therefore, within one-tenth of a degree,  $CT'_2 = RT_2 = 240^\circ$ . If  $B'_{k2}$  were positive,  $RT - CT'_2$  would be greater than  $0.1^\circ$ , and the solution would be completed by using steps 19—20 of problem XVII-A.

20.  $CT'_2 = RT_2 = 240^\circ =$  temperature of can at 11 minutes. (See curves XVII-B ( $CT'_2$ ), chart 8, sections B and B'.)

## PROBLEM XVIII-A

Divided process. Calculation of time necessary to reach a given temperature at center of can when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The temperature at center of can at time of change in retort temperature is given [item (5) under Specifications]; and
3.  $(RT_1 - CT'_1)$  and  $(RT_2 - CT'_2)$  have any values.

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (4) Second retort temperature.....( $RT_2 = 240^\circ$ )
- (5) Temperature at center of can at time of change in retort temperature.....( $CT'_b = 236^\circ$ )
- (6) Initial temperature.....( $IT = 180^\circ$ )
- (7)  $j = 1.41$ .

Find time necessary to reach

- $(x'_1) - 211^\circ$  ( $CT'_1$ ) in center of can, and  
 $(x'_2) - 237^\circ$  ( $CT'_2$ ) in center of can.

NOTE A: If value of  $x'_b$  were given instead of that of  $CT'_b$  [item (5) under Specifications], the methods of solution of problem XVIII-B would be followed.

Solutions:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1, find  $f_h = 62$  minutes for No. 2 cans.
3.  $I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ$ .
4.  $jI_1 = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ$ .
5.  $g'_{b1} = RT_1 - CT'_b = 250^\circ - 236^\circ = 14^\circ$ .
6. On chart 4; find, for  $jI_1 = 98.7^\circ$ ,  $B''_{k1} = 2.994$  minutes; and, for  $g'_{b1} = 14^\circ$ ,  $B'_{kb1} = 2.148$  minutes.
7.  $B''_{k1} - B'_{kb1} = 2.994 - 2.148 = 0.846$  minute.
8.  $x'_b = f_h(B''_{k1} - B'_{kb1}) = 62 \times 0.846 = 52.45$  minutes.

NOTE B: Since  $CT'_1$  ( $211^\circ$ ) is less than  $CT'_b$  ( $236^\circ$ ) the first point to be determined ( $x'_1$ ) falls before the change in retort temperature; and, since  $CT'_2$  ( $237^\circ$ ) is greater than  $CT'_b$ , the second point ( $x'_2$ ) falls after the change.

$x'_1$ :

9.  $g'_1 = RT_1 - CT'_1 = 250^\circ - 211^\circ = 39^\circ$ .
10. On chart 4; find, for  $g'_1 = 39^\circ$ ,  $B'_{k1} = 2.59$  minutes.
11.  $B''_{k1} - B'_{k1} = 2.994 - 2.590 = 0.404$  minute.
12.  $x'_1 = f_h(B''_{k1} - B'_{k1}) = 62 \times 0.404 = 25.05$  minutes = time necessary to reach  $211^\circ$ . (See curves XVIII-A ( $x'_1$ ), chart 8, sections A and A'.)

$x'_2$ :

13.  $s = RT_1 - RT_2 = 250 - 240^\circ = 10^\circ$ .
14.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 14^\circ - 10^\circ = 4^\circ$ .
15.  $g'_2 = RT_2 - CT'_2 = 240^\circ - 237^\circ = 3^\circ$ .
16. On chart 4; find, for  $g'_{b2} = 4^\circ$ ,  $B'_{kb2} = 1.60$  minutes; and, for  $g'_2 = 3^\circ$ ,  $B'_{k2} = 1.476$  minutes.
17.  $B'_{kb2} - B'_{k2} = 1.600 - 1.476 = 0.124$  minute.
18.  $x'_2 - x'_b = f_h(B'_{kb2} - B'_{k2}) = 62 \times 0.124 = 7.69$  minutes.
19.  $x'_2 = x'_b + (x'_2 - x'_b) = 52.45 + 7.69 = 60.14$  minutes = time necessary to reach  $237^\circ$ . (See curves XVIII-A ( $x'_2$ ), chart 8, sections A and A'.)

### PROBLEM XVIII-B

Divided process. Calculation of time necessary to reach a given temperature at center of can when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant);
2. The time of occurrence of change in retort temperature is given [item (5) under Specifications]; and
3.  $(RT_1 - CT'_1)$  and  $(RT_2 - CT'_2)$  have any values.

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (4) Second retort temperature.....( $RT_2 = 240^\circ$ )
- (5) Number of minutes retort held at first retort temperature....( $x'_b = 4$  minutes)
- (6) Initial temperature.....( $IT = 170^\circ$ )
- (7)  $j = 1.41$ .

Find time necessary to reach

- ( $x'_1$ )— $228^\circ$  ( $CT'_1$ ) in center of can,  
 ( $x'_2$ )— $239.9^\circ$  ( $CT'_2$ ) in center of can.

NOTE A: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (5) under Specifications], the methods of solution of problem XVIII-A would be followed.

Solutions:

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1, find  $f_h = 4.2$  for No. 2 cans.
3.  $I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 170^\circ = 80^\circ$ .
4.  $jI_1 = 1.41 \times 80^\circ = 112.8^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $jI_1 = 112.8^\circ$ ,  $B''_{k1} = 3.063$  minutes.
6.  $\frac{x'_b}{f_h} = \frac{4.0}{4.2} = 0.952$  minute.
7.  $B'_{kb1} = B''_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 3.063 - 0.952 = 2.111$  minutes.

8. On chart 4; find, for  $B'_{kb1} = 2.111$  minutes,  $g'_{b1} = 12.85^\circ$ .

9.  $CT'_b = RT_1 - g'_{b1} = 250.00^\circ - 12.85^\circ = 237.15^\circ$ .

NOTE B: Since  $CT'_1$  ( $228^\circ$ ) is less than  $CT'_b$  ( $237.15^\circ$ ), the first point to be determined ( $x'_1$ ) falls before the change in retort temperature; and, since  $CT'_2$  ( $239.9^\circ$ ) is greater than  $CT'_b$ , the second point ( $x'_2$ ) falls after the change.

$x'_1$ :

10.  $g'_1 = RT_1 - CT'_1 = 250^\circ - 228^\circ = 22^\circ$ .

11. On chart 4; find, for  $g'_1 = 22^\circ$ ,  $B'_{k1} = 2.343$  minutes.

12.  $B''_{k1} - B'_{k1} = 3.063 - 2.343 = 0.72$  minute.

13.  $x'_1 = f_h(B''_{k1} - B'_{k1}) = 4.20 \times 0.72 = 3.02$  minutes = time necessary to reach  $228^\circ$ . (See curves XVIII-B ( $x'_1$ ), chart 8, sections B and  $B'$ .)

$x'_2$ :

14.  $s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ$ .

15.  $g'_{b2} = g'_{b1} - s = 12.85^\circ - 10.00^\circ = 2.85^\circ$ .

16.  $g'_2 = RT_2 - CT'_2 = 240.0^\circ - 239.9^\circ = 0.1^\circ$ .

17. On chart 4; find, for  $g'_{b2} = 2.85^\circ$ ,  $B'_{kb2} = 1.453$  minutes; and, for  $g'_2 = 0.1^\circ$ ,  $B'_{k2} = 0$  minute.

18.  $B'_{kb2} - B'_{k2} = 1.453 - 0.000 = 1.453$  minutes.

19.  $x'_2 - x'_b = f_h(B'_{kb2} - B'_{k2}) = 4.2 \times 1.453 = 6.1$  minutes.

20.  $x'_2 = x'_b + (x'_2 - x'_b) = 4.0 + 6.1 = 10.1$  minutes = time necessary to reach  $239.9^\circ$ . (See curves XVIII-B ( $x'_2$ ), chart 8, sections B and  $B'$ .)

## PROBLEM XIX-A

Divided process. Calculation of the amount of lethal heat at center of can up to a given time, expressed as percentage of heat necessary to sterilize; when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and
2.  $(RT_1 - CT'_1)$  or  $(RT_2 - CT'_2)$  is greater than  $0.1^\circ$  (see note F).

Specifications:

- (1) Product.....(Corn—cream style)
- (2) Size of can.....(No. 2)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....( $F = 15$  minutes)
- (5) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (6) Second retort temperature.....( $RT_2 = 240^\circ$ )
- (7) Number of minutes retort held at first retort temperature.....( $x'_b = 52.5$  minutes)

[The value of  $CT'_b$  may be specified instead of  $x'_b$  (see notes A and C)]

- (8) Initial temperature.....( $IT = 180^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (10)  $j = 1.41$ .



Find percentage ( $P'_{\alpha_2}$ ) of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to  $60^\circ$  ( $x'_2$ ) minutes after beginning of process.

NOTE A: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (7) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note C.

NOTE B: Instead of  $x'_2$ , the value of  $CT'_2$  (temperature in center of can  $x'_2$  minutes after beginning of process) may be specified. If  $CT'_2$  were specified, the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note E.

Solution:

1. From table Z, p. 2-Z, Appendix, corn index number is 19.5.
2. Interpolating for curve 19.5 on chart 1, find  $f_h = 62$  minutes for No. 2 cans.
3.  $I_1 = RT_1 - IT = 250^\circ - 180^\circ = 70^\circ$ .
4.  $jI_1 = 1.41 \times 70^\circ = 98.7^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $jI_1 = 98.7^\circ$ ,  $B''_{k1} = 2.994$  minutes.

NOTE C: Steps 6—8, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If value of  $CT'_b$  were given as a condition of the problem instead of  $x'_b$  [item (7) under Specifications]; steps 6—8, below, would be replaced by steps 5—8 of problem IV, with  $x'_b$  substituted for  $x'$ ,  $g'_{b1}$  for  $g'$ , and  $B'_{kb1}$  for  $B'_k$ .

$$6. \frac{x'_b}{f_h} = \frac{52.5}{62.0} = 0.847 \text{ minute.}$$

$$7. B'_{kb1} = B''_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 2.994 - 0.847 = 2.147 \text{ minutes.}$$

$$8. \text{ On chart 4; find, for } B'_{kb1} = 2.147 \text{ minutes, } g'_{b1} = 14^\circ.$$

NOTE D: Since  $x'_2$  (60 minutes) is greater than  $x'_b$  (52.5 minutes), the point to be determined falls after the change in retort temperature. Thus, steps 9—16, below, are analogous to steps 13—20 of solution of problem XVII-A. If point to be determined fell before change in retort temperature, steps 9—12 of solution of problem XVII-A would be followed. In latter case, symbol,  $x'_1$ , should be used instead of  $x'_2$ . See note G, below.

NOTE E: If value of  $CT'_2$  were given as a condition of the problem instead of value of  $x'_2$ ; steps 9—16 would be replaced by steps 13—19, problem XVIII-A.

$$9. x'_2 - x'_b = 60.0 - 52.5 = 7.5 \text{ minutes.}$$

$$10. \frac{x'_2 - x'_b}{f_h} = \frac{7.5}{62} = 0.121 \text{ minute.}$$

$$11. s = RT_1 - RT_2 = 250^\circ - 240^\circ = 10^\circ.$$

$$12. g'_{b2} = g'_{b1} - s = 14^\circ - 10^\circ = 4^\circ.$$

$$13. \text{ On chart 4; find, for } g'_{b2} = 4^\circ, B'_{kb2} = 1.60 \text{ minutes.}$$

$$14. B'_{k2} = B'_{kb2} - \frac{x'_2 - x'_b}{f_h} = 1.600 - 0.121 = 1.479 \text{ minutes.}$$

NOTE F: If  $B'_{k2}$  were found to be negative, it would show that  $RT_2 - CT'_2$  is less than  $0.1^\circ$ , in which case, the solution from this point would follow that of problem XIX-B, (steps 15—33).

$$15. \text{ On chart 4; find, for } B'_{k2} = 1.479 \text{ minutes, } g'_2 = 3.01^\circ.$$

$$16. CT'_2 = RT_2 - g'_2 = 240.00^\circ - 3.01^\circ = 236.99^\circ = \text{temperature of can at 60 minutes.}$$

17. Use equation (23):

$$P'_{c2} = 100A'_{c2} = 100 \frac{f_h}{F} (Y'_{b1} - Y'_{b2} + Y_2) \quad (23)$$

NOTE G: If point to be determined fell before change in retort temperature, this problem would be same as a simple process problem; the symbols,  $x'_1$ ,  $g'_1$ , and  $Y'_1$ , would be used instead of  $x'_2$ ,  $g'_2$ , and  $Y'_2$ , respectively; and, since the point of change in retort temperature would not affect the problem, the terms,  $Y'_{b1}$  and  $Y'_{b2}$ , would be eliminated from equation (23) which would assume the form of equation (3) if  $RT_1 - CT'_1$  were greater than  $0.1^\circ$ ; and the solution from this point would follow that of problem VI-A (steps 10—16). If  $RT_1 - CT'_1$  were less than  $0.1^\circ$ , equation (5) would be used; as in the solution of problem VI-B (steps 9—20).

18.  $(m+g)_1 = RT_1 - CW = 250^\circ - 70^\circ = 180^\circ$ .

19. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$  and  $(m+g)_1 = 180^\circ$ ; find, for  $g'_{b1} = 14^\circ$ ,  $Y'_{220\ b1} = 0.000595$ .

20. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_1 = 250^\circ$  on scale B,  $Z'_{b1} = 46.4$ .

21.  $Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220\ b1} = 46.4 \times 0.000595 = 0.02781$ .

22.  $(m+g)_2 = RT_2 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ$ .

23. On chart 5, on curve,  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_2 = 170^\circ$ ; find, for  $g'_{b2} = 4^\circ$ ,  $Y'_{220\ b2} = 0.00507$ ; and, for  $g'_2 = 3.01^\circ$ ,  $Y_{220\ 2} = 0.00665$ .

24. On chart 2, on curve for  $z = 18^\circ$ ; find, for  $RT_2 = 240^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2} (= Z_2) = 12.9$ .

25.  $Y'_{b2} = Z'_{b2} Y_{220\ b2} = 12.9 \times 0.00507 = 0.06540$ .

26.  $Y_2 = Z_2 Y_{220\ 2} = 12.9 \times 0.00665 = 0.08578$ .

27.  $\frac{f_h}{F} = \frac{62}{15} = 4.133$ .

28.  $Y'_{b1} - Y'_{b2} + Y_2 = 0.02781 - 0.06540 + 0.08578 = 0.04819$ .

29.  $A'_{c2} = \frac{f_h}{F} (Y'_{b1} - Y'_{b2} + Y_2) = 4.133 \times 0.04819 = 0.1992$ .

30.  $P'_{c2} = 100A'_{c2} = 100 \times 0.1992 = 19.92 =$  percentage of lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can in 60 minutes of heating. (See curves XIX-A, chart 8, sections A and A'.)

NOTE H: If the desired percentage is to include effective lethal heat during cooling of can (assuming that water cooling of can begins  $x'_2$  [60] minutes after beginning of process), the solution is like that just given except that in place of equation (23) we have equation (24):

$$P'_2 = 100A'_2 = 100 \frac{f_h}{F} \left( Y'_{b1} - Y'_{b2} + \frac{Y_2}{\rho_2} \right) \quad (24)$$

and in place of steps 28—30, above, are substituted the following 5 steps:

28a. On chart 6, on curve for  $z = 18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_2 = 170^\circ$ ; find, for  $g'_2 = 3.01^\circ$ ,  $\rho_2 = 0.8405$ .

29a.  $\frac{Y_2}{\rho_2} = \frac{0.08578}{0.84050} = 0.10206$ .

30a.  $Y'_{b1} - Y'_{b2} + \frac{Y_2}{\rho_2} = 0.02781 - 0.06540 + 0.10206 = 0.06447$ .

31a.  $A'_2 = \frac{f_h}{F} \left( Y'_{b1} - Y'_{b2} + \frac{Y_2}{\rho_2} \right) = 4.133 \times 0.06447 = 0.2665$ .

32a.  $P'_2 = 100A'_2 = 100 \times 0.2665 = 26.65 =$  percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can during 60 minutes of heating plus necessary time for cooling in water.

## PROBLEM XIX-B

Divided process. Calculation of the amount of lethal heat at center of can up to a given time, expressed as percentage of heat necessary to sterilize; when

1. The heating curve (for one retort temperature) is a simple logarithmic curve ( $f_h$  is constant); and
2.  $(RT_1 - CT'_1)$  or  $(RT_2 - CT'_2)$  is less than  $0.1^\circ$  (see note F).

Specifications:

- (1) Product.....(Peas)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z=18^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....  
.....( $F=18$  minutes)
- (5) First retort temperature.....( $RT_1=255^\circ$ )
- (6) Second retort temperature.....( $RT_2=240^\circ$ )
- (7) Number of minutes retort held at first retort temperature....( $x'_b=8$  minutes)  
[The value of  $CT'_b$  may be specified instead of  $x'_b$  (see notes A and C)]
- (8) Initial temperature.....( $IT=160^\circ$ )
- (9) Cooling water temperature.....( $CW=70^\circ$ )
- (10)  $j=1.41$ .

Find percentage ( $P'_{c2} < .1$ ) of the lethal heat necessary to sterilize, which is effective at center of can up to 45 ( $x'_2$ ) minutes after beginning of process.

NOTE A: If value of  $CT'_b$  were given instead of that of  $x'_b$  [item (7) under Specifications], the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note C.

NOTE B: Instead of  $x'_2$ , the value of  $CT'_2$  (temperature at center of can  $x'_2$  minutes after beginning of process) may be specified. If  $CT'_2$  were specified, the method of solution would be the same as that given below with exception of changes explained in note E.

Solution:

1. From table Z, p. 3-Z, Appendix, peas index number is 1.3.
2. Interpolating for curve 1.3 on chart 1, find  $f_h=13$  minutes for No. 10 cans.
3.  $I_1 = RT_1 - IT = 255^\circ - 160^\circ = 95^\circ$ .
4.  $jI_1 = 1.41 \times 95^\circ = 134^\circ$ .
5. On chart 4; find, for  $jI_1 = 134^\circ$ ,  $B''_{k1} = 3.127$  minutes.

NOTE C: Steps 6—8, below, are in accordance with problem V (steps 6—8). If value of  $CT'_b$  were given as a condition of the problem instead of  $x'_b$  [item (7) under Specifications], steps 6—8, below, would be replaced by steps 5—8 of problem IV with  $x'_b$  substituted for  $x'$ ,  $g'_{b1}$  for  $g'$ , and  $B'_{kb1}$  for  $B'_k$ .

6.  $\frac{x'_b}{f_h} = \frac{8}{13} = 0.616$  minute.

$$7. B'_{kb1} = B''_{k1} - \frac{x'_b}{f_h} = 3.127 - 0.616 = 2.511 \text{ minutes.}$$

$$8. \text{ On chart 4; find, for } B'_{kb1} = 2.511 \text{ minutes, } g'_{b1} = 32.2^\circ.$$

NOTE D: Since  $x'_2$  (45 minutes) is greater than  $x'_b$  (8 minutes), the point to be determined falls after the change in retort temperature. Thus, steps 9—14, below, are analogous to steps 14—19 of solution of problem XVII-B. If point to be determined fell before change in retort temperature, steps 10—12 of solution of problem XVII-B would be followed. In latter case, symbol  $x'_1$  should be used instead of  $x'_2$ . See note G, below.

NOTE E: If value of  $CT'_2$  were given as a condition of the problem instead of value of  $x'_2$ ; steps 9—15 would be replaced by steps 14—20 of problem XVIII-B.

$$9. x'_2 - x'_b = 45 - 8 = 37 \text{ minutes.}$$

$$10. \frac{x'_2 - x'_b}{f_h} = \frac{37}{13} = 2.846 \text{ minutes.}$$

$$11. s = RT_1 - RT_2 = 255^\circ - 240^\circ = 15^\circ.$$

$$12. g'_{b2} = g'_{b1} - s = 32.2^\circ - 15.0^\circ = 17.2^\circ.$$

$$13. \text{ On chart 4; find, for } g'_{b2} = 17.2^\circ, B'_{kb2} = 2.238 \text{ minutes.}$$

$$14. B'_{k2} = B'_{kb2} - \frac{x'_2 - x'_b}{f_h} = 2.238 - 2.846 = -0.608 \text{ minute.}$$

NOTE F: Since  $B'_{k2}$  is negative,  $RT_2 - CT'_2$  is shown to be less than  $0.1^\circ$ . Therefore, within one-tenth of a degree,  $CT_2 = RT_2 = 240^\circ$ . If  $B'_{k2}$  were positive,  $RT_2 - CT'_2$  would be greater than  $0.1^\circ$ , and the solution would be completed by using steps 15—30 of problem XIX-A.

$$15. B'_{2 < .1} = -f_h B'_{k2} = -\left[13 \times (-0.608)\right] = 7.904 \text{ minutes.}$$

$$16. \text{ Use equation (25):}$$

$$P'_{c2 < .1} = 100A'_{c2 < .1} = 100 \frac{f_h}{F} (Y'_{b1} - Y'_{b2} + Y_{2.1}) + \frac{B'_{2 < .1}}{U_2} \quad (25)$$

NOTE G: If point to be determined fell before change in retort temperature, this problem would be same as a simple process problem; the symbols,  $x'_1$ ,  $g'_1$ , and  $Y'_1$ , would be used instead of  $x'_2$ ,  $g'_2$ , and  $Y'_2$ , respectively; and, since the point of change in retort temperature would not affect the problem, the terms,  $Y'_{b1}$  and  $Y'_{b2}$ , would be eliminated from equation (25) which would assume the form of equation (5) if  $RT_1 - CT'_1$  were less than  $0.1^\circ$ , and the solution from this point would follow that of problem VI-B (steps 9—20). If  $RT_1 - CT'_1$  were greater than  $0.1^\circ$ , equation (3) would be used; as in the solution of problem VI-A (steps 10—16).

$$17. (m+g)_1 = RT_1 - CW = 255^\circ - 70^\circ = 185^\circ.$$

$$18. \text{ On chart 5, on curve, } z = 18^\circ, \text{ extrapolating for } (m+g)_1 = 185^\circ; \text{ find, for } g'_{b1} = 32.2^\circ, Y'_{220 \ b1} = 0.0000275.$$

$$19. \text{ On chart 2, on curve for } z = 18^\circ; \text{ find, for } RT_1 = 255^\circ \text{ on scale B, } Z'_{b1} = 87.8.$$

$$20. Y'_{b1} = Z'_{b1} Y'_{220 \ b1} = 87.8 \times 0.0000275 = 0.00241.$$

$$21. (m+g)_2 = RT_2 - CW = 240^\circ - 70^\circ = 170^\circ.$$

$$22. \text{ On chart 5, on curve, } z = 18^\circ, \text{ interpolating for } (m+g)_2 = 170^\circ; \text{ find, for } g'_{b2} = 17.2^\circ, Y'_{220 \ b2} = 0.000329; \text{ and, for } g = 0.1^\circ, Y_{220 \ 2.1} = 0.0353.$$



23. On chart 2, on curve for  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_2=240^\circ$  on scale B,  $Z'_{b2}(=Z_{2.1})=12.9$ .
24.  $Y'_{b2}=Z_{b2}Y_{220\ b2}=12.9\times 0.000329=0.00424$ .
25.  $Y_{2.1}=Z_{2.1}Y_{220\ 2.1}=12.9\times 0.0353=0.45537$ .
26. On chart 2, on curve,  $z=18^\circ$ ; find, for  $RT_2=240^\circ$  on scale A,  $F_{i2}=3.61$  minutes.
27.  $U_2=FF_{i2}=18\times 3.61=65.0$  minutes.
28.  $\frac{B'_{2<.1}}{U}=\frac{7.904}{65.0}=0.1215$ .
29.  $\frac{f_h}{F}=\frac{13}{18}=0.722$ .
30.  $Y_{b1}-Y_b+Y_{2.1}=0.00241-0.00424+0.45537=0.45354$ .
31.  $\frac{f_h}{F}(Y_{b1}-Y_b+Y_{2.1})=0.722\times 0.45354=0.3275$ .
32.  $A'_{c2<.1}=\frac{f_h}{F}(Y'_{b1}-Y'_{b2}+Y_{2.1})+\frac{B'_{2<.1}}{U_2}=0.3275+0.1215=0.4490$ .
33.  $P'_{c2<.1}=100A'_{c2<.1}=100\times 0.4490=44.90$ =percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can in 45 minutes of heating. (See curves XIX-B, chart 8, sections B and B'.)

NOTE H: If the desired percentage is to include effective lethal heat during cooling of can (assuming that water cooling of can begins  $x'_2$  [45] minutes after beginning of process), the solution is like that just given except that in place of equation (25) we have equation (26):

$$P'_{2<.1}=100A'_{2<.1}=100\frac{f_h}{F}\left[Y'_{b1}-Y'_{b2}+\frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}}\right]+\frac{B'_{2<.1}}{U_2} \quad (26)$$

and in place of steps 30—33, above, are substituted the following 6 steps:

- 30a. On chart 6, on curve for  $z=18^\circ$ , interpolating for  $(m+g)_2=170^\circ$ ; find, for  $g=0.1^\circ$ ,  $\rho_{2.1}=0.9460$ .
- 31a.  $\frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}}=\frac{0.45537}{0.9460}=0.48129$ .
- 32a.  $Y'_{b1}-Y'_{b2}+\frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}}=0.00241-0.00424+0.48129=0.47946$ .
- 33a.  $\frac{f_h}{F}\left(Y'_{b1}-Y'_{b2}+\frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}}\right)=0.722\times 0.47946=0.3462$ .
- 34a.  $A'_{2<.1}=100\frac{f_h}{F}\left(Y'_{b1}-Y'_{b2}+\frac{Y_{2.1}}{\rho_{2.1}}\right)+\frac{B'_{2<.1}}{U_2}=0.3462+0.1215=0.4677$ .
- 35a.  $P'_{2<.1}=100A'_{2<.1}=100\times 0.4677=46.77$ =percentage of the lethal heat necessary to sterilize, effective at center of can during 45 minutes of heating plus necessary time for cooling in water.

## IV

## CLASS 2, GROUP 2

## PROBLEM XX

Divided process. Calculation of length of process when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ).

NOTE A: When we come to the point of applying a two-temperature process to a product having a break in the heating curve, we have passed so far beyond the simple condition of a product having a straight logarithmic heating curve subjected to a simple, or a one-temperature, process, that the easiest method of solving is the general method, the use of which has been displaced in the simpler problems by formulae.

Since the method of solution is entirely general, it applies to any conditions; so that it is not necessary for us to restrict its use to a product having one break in heating curve and being given a divided process. Any heating curve may be used, and any kind of a process may be involved. This problem is solved for heating curve XX plotted on chart 8, sections A and A'. We assume that this curve has been determined experimentally and carried to a point which is certain to be well beyond that which represents sterilization; and a cooling curve has been determined starting at this point.

Specifications:

- (1) Product.....(W)
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 16^\circ$ )
- (4) Number of minutes required to destroy the organism at  $250^\circ$ .....  
.....( $F = 12$  minutes)
- (5) First retort temperature.....( $RT_1 = 250^\circ$ )
- (6) Second retort temperature.....( $RT_2 = 242^\circ$ )
- (7) Number of minutes retort held at first retort temperature. ( $x'_b = 32$  minutes)
- (8) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 20$  minutes)
- (9) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 27$  minutes)
- (10) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 120$  minutes)
- (11) Initial temperature.....( $IT = 160^\circ$ )
- (12) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (13)  $j = 1.08$ .

Find process,  $B_{Bh2}$ , necessary for sterilization.

## Solution:

1. If cooling curves cannot be determined experimentally at other points than the final point on the heating curve, approximate cooling curves should be constructed by reproducing the experimentally determined cooling curve at two or three points along the heating curve after the point of change in its slope (see the broken line cooling curves at points, V and W, chart 8, section A'). These points should be distributed over a range which is certain to include the sterilization point.

NOTE B: If a cooling curve is constructed so as to start at or before the point of break in heating curve (see cooling curve, UL, at 20 minutes, chart 8, section A'), it should have slope value,  $f_{h1}$ , instead of that of a cooling curve obtained experimentally at a later point.

2. Construct a table of seven columns (see Table 20-1, step 9).
3. List in columns 1 and 2 a succession of time values extending through the range covered by; 1st, the complete heating curve; 2nd, each of the cooling curves.
4. Tabulate in column 3 the temperature of the can—taken from the heating and cooling curves—corresponding to each time value listed in columns 1 and 2.
5. Tabulate in column 4 the value,  $250^\circ$  minus can temperature [ $250^\circ - CT$ ], for each value of  $CT$  listed in column 3.
6. Tabulate in column 5 the value,  $250^\circ$  minus can temperature, divided by  $z$ ,— $z$  representing slope of thermal death time curve [item (3) under Specifications]—for each value of  $250^\circ - CT$  listed in column 4.
7. Get values of  $\frac{t}{F}$  for column 6 by taking the anti-log of the values in column 5.

$$\frac{t}{F} = \log^{-1} \left[ \frac{250^\circ - CT}{z} \right].$$

8. Place the reciprocals of  $\frac{t}{F}$  in column 7.
9. The table, solved for this problem, is as follows:

TABLE 20-1  
DEVELOPMENT OF DATA USED IN PLOTTING LETHALITY CURVES

Time on curves		CT	250°-CT	$\frac{250^{\circ}-CT}{z}$	$\frac{t}{F}$	$\frac{F}{t}$
Heating curve	Cooling curves					
5	.....	187.5	62.5	3.903	8000.00	0.000125
7	.....	196.5	53.5	3.342	2200.00	0.000455
10	.....	209.2	40.8	2.550	354.50	0.00282
15	.....	222.8	27.2	1.700	50.05	0.01997
20	.....	232.3	17.7	1.107	12.80	0.07815
.....	20	232.3	17.7	1.107	12.80	0.07815
.....	21	222.4	27.6	1.727	53.35	0.01876
.....	22	212.0	38.0	2.376	238.00	0.0042
.....	23	202.0	48.0	3.000	1000.00	0.001
.....	24	192.0	58.0	3.624	4200.00	0.000238
25	.....	234.0	16.0	1.000	10.00	0.100
30	.....	235.4	14.6	0.914	8.20	0.122
35	.....	236.5	13.5	0.845	7.00	0.143
40	.....	237.0	13.0	0.813	6.50	0.154
.....	40	237.0	13.0	0.813	6.50	0.154
.....	42	235.8	14.2	0.889	7.74	0.1292
.....	45	233.6	16.4	1.027	10.66	0.0939
.....	50	228.6	21.4	1.338	21.75	0.0460
.....	55	220.7	29.3	1.831	67.85	0.01473
.....	60	210.8	39.2	2.448	280.30	0.00356
.....	65	200.5	49.5	3.093	1240.00	0.000807
50	.....	237.7	12.3	0.770	5.89	0.170
60	.....	238.4	11.6	0.726	5.32	0.188
70	.....	239.1	10.9	0.681	4.80	0.2083
80	.....	239.6	10.4	0.651	4.47	0.2238
.....	80	239.6	10.4	0.651	4.47	0.2238
.....	82	238.4	11.6	0.726	5.32	0.188
.....	85	236.3	13.7	0.857	7.20	0.139
.....	90	231.3	18.7	1.169	14.75	0.0679
.....	95	222.8	27.2	1.700	50.05	0.01997
.....	100	213.5	36.5	2.281	191.20	0.00524
.....	105	202.9	47.1	2.946	884.00	0.001132
100	.....	240.3	9.7	0.606	4.04	0.248
110	.....	240.6	9.4	0.587	3.86	0.259
120	.....	240.8	9.2	0.575	3.76	0.266
140	.....	241.2	8.8	0.550	3.55	0.282
.....	140	241.2	8.8	0.550	3.55	0.282
.....	142	240.2	9.8	0.612	4.10	0.244
.....	145	238.2	11.8	0.739	5.48	0.183
.....	150	234.0	16.0	1.000	10.00	0.100
.....	155	226.1	23.9	1.493	31.10	0.0322
.....	160	215.8	34.2	2.139	138.70	0.00726
.....	165	205.5	44.5	2.780	602.00	0.00166



10. Plot  $\frac{F}{t}$  (column 7, table 20-1) against time (columns 1 and 2, table 20-1).

See chart 9: curve JUVWY representing heating; and curves UL, VN, WG, and YS representing cooling. These curves are called *lethality curves*.

11. Find size of *unit sterilization area* on the lethality diagram. By unit sterilization area is meant the area which, if enclosed beneath the lethality curves of a process, represents complete sterilization when the value of  $F$  is 1. The size of this area depends upon the sizes of the scales chosen for the lethality diagram. To find the size, choose arbitrarily, along the vertical scale, a distance that is convenient to work with, such as that representing 0.02 or 0.04 of a unit along the scale. This will be the height of the area. The breadth is found by dividing this arbitrarily chosen height into 1, which, by definition, represents the magnitude of the area in terms of its rectangular components, *lethal rate* and *time*.

For example, ABCD is unit sterilization area on lethality diagram, chart 9. To determine this area, 0.04 was arbitrarily chosen as its height.

Then, its breadth was found as the reciprocal of 0.04 unit  $\left[ \frac{1.0}{0.04} \right]$ , or 25 units on the horizontal scale. The rectangular area may be laid off anywhere along either scale; the important point is to make it the proper height and breadth. The magnitude of area, ABCD, may be represented in terms of the scale units to which it is plotted by the expression:  $(0.04 - 0.00)(50.0 - 25.0) = 0.04 \times 25.0 = 1.0$ .

There are found to be 10 large squares, or 1,000 small squares, in the unit sterilization area. Therefore, theoretically, if  $F=1$ , a process has a sterilizing value of 100 per cent when it is represented by a heating and a cooling curve, the lethality curves for which, plotted to the scales used on chart 9, enclose 1,000 small squares.

12. With the value of  $z$  remaining constant, the area beneath lethality curves which represents complete sterilization varies directly as the value of  $F$ .

By virtue of the vertical scale unit value,  $\frac{F}{t}$  (which is  $F$  times the lethal rate), the area of the lethality curve on chart 9 is  $F$  times the true lethal value of the process. Therefore, the area, to represent complete sterilization, must equal  $F$  instead of unity. Therefore, since, in our problem,  $F=12$  minutes, the lethality curves that represent the calculated process must enclose an area 12 times as great as the unit sterilization area, or 12,000 small squares.

13. Get areas beneath lethality curves, representing the heating and cooling curves combined, for each given position of cooling curve (U, 20 minutes; V, 40 minutes; W, 80 minutes; and Y, 140 minutes) either by counting squares or by means of a planimeter. These areas, in terms of squares and of sterilization units, and their interpretation in terms of per cent sterilization are given in table 20-2. By *per cent sterilization* is meant the percentage of the amount of lethal heat necessary to sterilize, which has been effective at the center of the can.

TABLE 20-2

AREAS BENEATH LETHALITY CURVES (HEATING AND COOLING COMBINED) AND THEIR INTERPRETATION IN TERMS OF STERILIZATION

Designation of area on lethality curve	Time on lethality heating curve to which the area corresponds [minutes]	Area in small squares	Area in sterilization units [Equal to area in small squares (column 3) divided by number of small squares in <i>F</i> times sterilization unit area]	Per cent sterilization
JULJ	20	342	$0.0285 \left( = \frac{342}{12,000} \right)$	2.85
JUVNJ	40	3,834	$0.3196 \left( = \frac{3,834}{12,000} \right)$	31.96
JUVWQJ	80	11,932	$0.9952 \left( = \frac{11,932}{12,000} \right)$	99.52
JUVWYSJ	140	27,953	$2.3260 \left( = \frac{27,953}{12,000} \right)$	232.60

14. Plot a curve—per cent sterilization against time—using data given in the second and fifth columns of table 20-2. See curve EF, chart 9. The intersection of this curve with the horizontal line representing 100 per cent (point XX on curve EF) marks the length of time the process must go to complete sterilization during the two operations of heating and cooling. This is 80.3 minutes. The corresponding point on lethality curve, JUVWY, also, is marked XX.

NOTE C: If it is desired to exclude from consideration the sterilizing effect of the cooling period and obtain the percentage of lethal heat effective at center of can up to any moment during the heating, the areas beneath the lethality heating curve only are obtained up to four different points along this curve. For this solution, we shall assume the same points as those previously considered (from which the cooling curves are drawn). Steps 13 and 14 above, are replaced by the following 2 steps:

13a. Form table 20-3 following plan of table 20-2:

TABLE 20-3

AREAS BENEATH LETHALITY HEATING CURVE ONLY, AND THEIR INTERPRETATION IN TERMS OF STERILIZATION

Designation of area on lethality curve	Time on lethality heating curve to which the area corresponds [minutes]	Area in small squares	Area in sterilization units [Equal to area in small squares (column 3) divided by number of small squares in <i>F</i> times sterilization unit area]	Per cent sterilization
JUKJ	20	279	$0.0233 \left( = \frac{279}{12,000} \right)$	2.33
JUVMJ	40	2,690	$0.2241 \left( = \frac{2,690}{12,000} \right)$	22.41
JUVWPJ	80	10,224	$0.8541 \left( = \frac{10,224}{12,000} \right)$	85.41
JUVWYRJ	140	25,600	$2.1355 \left( = \frac{25,600}{12,000} \right)$	213.55

- 14a. Plot a curve—per cent sterilization against time—using data given in the second and fifth columns of table 20-3. This is curve EG on chart 9. The intersection of this curve with the horizontal line representing 100 per cent (point XXh on curve EG) marks the length of time the process must go to complete sterilization during the heating period only—without considering the sterilizing effect of the cooling period. This is 88.3 minutes. The corresponding point on lethality curve, JUVWY, also, is marked XXh.

NOTE D: The reason for the rapid separation of curves EF and EG just to the right of the 20 minute point is that cooling curves which have their origin after 20 minutes [ $x_{bh}$ ] are taken to have a slope value of  $f_2$ , whereas those that start previously to or at 20 minutes are given slope value,  $f_{h1}$ . See note B.

### PROBLEM XXI

Divided process. Calculation of a divided process equivalent to a given divided process at different retort temperatures and different initial temperature when

1. There is a break in the heating curve (slope changes from  $f_{h1}$  to  $f_2$ ).

NOTE A: A process is calculated which is equivalent to that found in problem XX for the same can. Since the retort temperatures and the initial temperature are all lowered four degrees, the heating curve for both problems is the same when plotted on semi-logarithmic paper (curve XX and XXI, chart 8, section A'). On squared coordinate paper, however, the curves are different (curves XX and XXI, chart 8, section A).

Specifications:

- (1) Product.....( $W$ )
- (2) Size of can.....(No. 10)
- (3) Slope of thermal death time curve.....( $z = 18^\circ$ )
- (4) First retort temperature.....( $RT_1 = 246^\circ$ )
- (5) Second retort temperature.....( $RT_2 = 238^\circ$ )
- (6) Number of minutes retort held at first retort temperature..( $x'_b = 32$  minutes)
- (7) Number of minutes between beginning of process and break in heating curve.....( $x'_{bh} = 20$  minutes)
- (8) Slope of heating curve before break.....( $f_{h1} = 27$  minutes)
- (9) Slope of heating curve after break.....( $f_2 = 120$  minutes)
- (10) Initial temperature.....( $IT = 156^\circ$ )
- (11) Cooling water temperature.....( $CW = 70^\circ$ )
- (12)  $j = 1.08$ .
- (13) Process necessary for sterilization at other retort and initial temperatures....  
.....( $B_{Bh2a} = 80.3$  minutes with  $IT = 160^\circ$   
and  $RT_{1a} = 250^\circ$ , held for 32 [ $x'_b$ ] minutes, then lowered to  $RT_{2a} = 242^\circ$ )

Find process,  $B_{Bh2}$ , necessary for sterilization with  $246^\circ$ — $238^\circ$  retort temperatures and  $156^\circ$  initial temperature.

Solution:

1. It is assumed that the heating and cooling curves for the temperature conditions of both the given process and the process to be calculated have been determined experimentally and plotted. (See curves XX and XXI, chart 8, sections A and A'.) For the given process, only one cooling curve needs to be determined. This is at the end of the process as given; In this case, at 80.3 minutes (curve XX—T, chart 8, section A'). If cooling curves cannot be determined experimentally at other points than the final point on the heating curve representing the process to be calculated, approximate cooling curves should be constructed by reproducing the experimentally determined cooling curve at two or three points along the heating curve after the point of change in its slope (see the broken line cooling curves at points, V' and W', chart 8, section A'). These points should be distributed over a range which is certain to include the sterilization point.

NOTE B: If a cooling curve is constructed so as to start at or before the point of break in heating curve (see cooling curve, U'L', chart 8, section A), it should have slope value,  $f_{h1}$ , instead of that of a cooling curve obtained experimentally at a later point.

2. Construct a table of seven columns (see table 21-1, step 9).
3. List in columns 1 and 2 a succession of time values extending through the range covered by the heating and cooling curves of the given process.
4. Tabulate in column 3 the temperature of the can—taken from the heating and cooling curves of the given process—corresponding to each time value listed in columns 1 and 2.
5. Tabulate in column 4 the value,  $250^\circ$  minus can temperature [ $250^\circ - CT$ ], for each value of  $CT$  listed in column 3.
6. Tabulate in column 5 the value,  $250^\circ$  minus can temperature, divided by  $z$ ,— $z$  representing slope of thermal death time curve [item (3) under Specifications]—for each value of  $250^\circ - CT$  listed in column 4.
7. Get values of  $\frac{t}{F}$  for column 6 by taking the anti-log of the values in column 5.

$$\frac{t}{F} = \log^{-1} \left[ \frac{250^\circ - CT}{z} \right].$$

8. Place the reciprocals of  $\frac{t}{F}$  in column 7.
9. The table, solved for the given process, is as follows:



TABLE 21-1

DEVELOPMENT OF DATA USED IN PLOTTING LETHALITY CURVE FOR THE GIVEN PROCESS

Time on curves		CT	250°-CT	$\frac{250^{\circ}-CT}{z}$	$\frac{t}{F}$	$\frac{F}{t}$
Heating curve	Cooling curves					
5	.....	187.5	62.5	3.903	8000.00	0.000125
7	.....	196.5	53.5	3.342	2200.00	0.000455
10	.....	209.2	40.8	2.550	354.50	0.00282
15	.....	222.8	27.2	1.700	50.05	0.01997
20	.....	232.3	17.7	1.107	12.80	0.07815
25	.....	234.0	16.0	1.000	10.00	0.100
30	.....	235.4	14.6	0.914	8.20	0.122
35	.....	236.5	13.5	0.845	7.00	0.143
40	.....	237.0	13.0	0.813	6.50	0.154
50	.....	237.7	12.3	0.770	5.89	0.170
60	.....	238.4	11.6	0.726	5.32	0.188
70	.....	239.1	10.9	0.681	4.80	0.208
80.3	.....	239.6	10.4	0.650	4.47	0.224
.....	80.3	239.6	10.4	0.650	4.47	0.224
.....	82	239.25	10.75	0.677	4.65	0.215
.....	85	236.6	13.4	0.838	6.88	0.1452
.....	90	231.8	18.2	1.138	13.73	0.0728
.....	95	223.7	26.3	1.643	43.95	0.02277
.....	100	214.3	35.7	2.230	170.00	0.00589
.....	105	204.2	45.8	2.860	725.00	0.00138

10. Plot  $\frac{F}{t}$  (column 7, table 21-1) against time (columns 1 and 2, table 21-1).

See chart 9: curve JUV-XX representing heating; and curve XX-T representing cooling. These are the *lethality curves* of the given process.

11. Find size of *unit sterilization area* on the lethality diagram. By unit sterilization area is meant the area which, if enclosed beneath the lethality curves of a process, represents complete sterilization when the value of  $F$  is 1. The size of this area depends upon the sizes of the scales chosen for the lethality diagram. To find the size, choose arbitrarily, along the vertical scale, a distance that is convenient to work with, such as that representing 0.02 or 0.04 of a unit along the scale. This will be the height of the area. The breadth is found by dividing this arbitrarily chosen height into 1, which, by definition, represents the magnitude of the area in terms of its rectangular components, *lethal rate* and *time*.

For example, ABCD is unit sterilization area on lethality diagram, chart 9.

To determine this area, 0.04 was arbitrarily chosen as its height. Then, its breadth was found as the reciprocal of 0.04 unit  $\left[ \frac{1.0}{0.04} \right]$ , or 25 units on the horizontal scale. The rectangular area may be laid off anywhere along either scale; the important point is to make it the proper height and breadth. The magnitude of area, ABCD, may be represented in terms of the scale units to which it is plotted by the expression:

$$(0.04 - 0.00)(50.0 - 25.0) = 0.04 \times 25.0 = 1.0.$$

There are found to be 10 large squares, or 1000 small squares, in the unit sterilization area.

12. Find the area beneath the lethality curves: 10,290 small squares beneath the heating portion, JUV-XX; and 1,710 small squares beneath the cooling portion XX-I; a total area of 12,000 small squares.
13.  $F$  equals area beneath lethality curves divided by unit sterilization area;
- $$= \frac{12,000}{1,000} = 12 \text{ minutes.}$$

NOTE C: Finding the value of  $F$  in the manner just shown simply locates the thermal death time curve for which the given process (80.3 minutes at retort temperatures, 250°—242° and initial temperature, 160°) is the minimum that will accomplish complete sterilization. The remaining part of the solution consists of finding the time that will be necessary with retort temperatures, 246°—238°, and initial temperature, 156°, to give an equivalent process. This part of the problem is analogous to problem XX.

14. Form table 21-2, following plan of table 21-1, applying it to the heating curve, J'U'V'W'Y', and the cooling curves, U'L', V'N', W'Q', and Y'S' (chart 8, section A'), of the process to be calculated:

TABLE 21-2

DEVELOPMENT OF DATA USED IN PLOTTING LETHALITY CURVES FOR THE PROCESS TO BE CALCULATED

Time on curves		CT	250°-CT	$\frac{250^{\circ}-CT}{z}$	$\frac{t}{F}$	$\frac{F}{t}$
Heating curve	Cooling curves					
5	.....	183.5	66.5	4.152	14200.00	0.0000705
7	.....	192.5	57.5	3.593	3918.00	0.0001556
10	.....	205.2	44.8	2.800	630.50	0.001585
15	.....	218.8	31.2	1.950	89.05	0.01122
20	.....	228.3	21.7	1.357	22.76	0.04397
.....	20	228.3	21.7	1.357	22.76	0.04397
.....	21	218.4	31.6	1.974	94.10	0.01062
.....	22	208.0	42.0	2.623	420.00	0.002382
.....	23	198.0	52.0	3.248	1770.00	0.000565
.....	24	188.0	62.0	3.874	7477.00	0.0001337
25	.....	230.0	20.0	1.250	17.78	0.05625
30	.....	231.4	18.6	1.162	14.53	0.0688
35	.....	232.5	17.5	1.093	12.40	0.0807
40	.....	233.0	17.0	1.062	11.54	0.0866
.....	40	233.0	17.0	1.062	11.54	0.0866
.....	42	231.8	18.2	1.137	13.71	0.0730
.....	45	229.6	20.4	1.274	18.80	0.0532
.....	50	224.6	25.4	1.587	38.62	0.02587
.....	55	216.7	33.3	2.080	120.30	0.00831
.....	60	206.8	43.2	2.700	501.00	0.001995
.....	65	196.5	53.5	3.341	2195.00	0.000456
50	.....	233.7	16.3	1.019	10.45	0.0957
60	.....	234.4	15.6	0.976	9.46	0.1057
70	.....	235.1	14.9	0.932	8.55	0.1170
80	.....	235.6	14.4	0.901	7.96	0.1256
.....	80	235.6	14.4	0.901	7.96	0.1256
.....	82	234.4	15.6	0.976	9.46	0.1057
.....	85	232.3	17.7	1.107	12.80	0.0781
.....	90	227.3	22.7	1.418	26.20	0.0382
.....	95	218.8	31.2	1.950	89.10	0.01122
.....	100	209.5	40.5	2.530	338.80	0.00295
.....	105	198.9	51.1	3.196	1571.00	0.000636
100	.....	236.3	13.7	0.857	7.20	0.1390
110	.....	236.6	13.4	0.838	6.87	0.1454
120	.....	236.8	13.2	0.826	6.70	0.1490
140	.....	237.2	12.8	0.801	6.33	0.1580
.....	140	237.2	12.8	0.801	6.33	0.1580
.....	142	236.2	13.8	0.863	7.30	0.1371
.....	145	234.2	15.8	0.988	9.72	0.1028
.....	150	230.0	20.0	1.250	17.78	0.05625
.....	155	222.1	27.9	1.743	55.35	0.01807
.....	160	211.8	38.2	2.385	242.60	0.00412
.....	165	201.5	48.5	3.028	1067.00	0.000937

15. Plot  $\frac{F}{t}$  (column 7, table 21-2) against time (columns 1 and 2, table 21-2). See chart 9: curve JU'V'W'Y' representing heating; and curves, U'L', V'N', W'Q', and Y'S', representing cooling. These are the lethality curves of the process to be calculated.
16. Get areas beneath lethality curves, representing the heating and cooling curves combined, for each given position of cooling curve (U', 20 minutes; V', 40 minutes; W', 80 minutes; and Y', 140 minutes) either by counting squares or by means of a planimeter. These areas, in terms of squares and of *sterilization units*, and their interpretation in terms of per cent sterilization are given in table 21-3. By *per cent sterilization* is meant the percentage of the amount of lethal heat necessary to sterilize, which has been effective at the center of the can.
- Since  $F=12$  minutes, the lethality curves that represent the process being calculated must enclose an area 12 times as great as unit sterilization area, or  $12 \times 1,000 = 12,000$  small squares.

TABLE 21-3

AREAS BENEATH LETHALITY CURVES (HEATING AND COOLING COMBINED) AND THEIR INTERPRETATION IN TERMS OF STERILIZATION

Designation of area on lethality curve	Time on lethality heating curve to which the area corresponds [minutes]	Area in small squares	Area in sterilization units [Equal to area in small squares (column 3) divided by number of small squares in $F$ times sterilization unit area]	Per cent sterilization
JU'L'J	20	190	$0.0158 \left( = \frac{190}{12,000} \right)$	1.58
JU'V'N'J	40	2,163	$0.1803 \left( = \frac{2,163}{12,000} \right)$	18.03
JU'V'W'Q'J	80	6,677	$0.5555 \left( = \frac{6,677}{12,000} \right)$	55.55
JU'V'W'Y'S'J	140	15,667	$1.3050 \left( = \frac{15,667}{12,000} \right)$	130.50

17. Plot a curve—per cent sterilization against time—using data given in the second and fifth columns of table 21-3. See curve EF', chart 9. The intersection of this curve with the horizontal line representing 100 per cent (point XXI on curve EF') marks the length of time the process must go to complete sterilization during the two operations of heating and cooling. This is 119.5 minutes. The corresponding point on lethality curve, JU'V'W'Y', also, is marked XXI. (See, also, curve XXI, chart 8, section A.)



NOTE D: If it is desired to exclude from consideration the sterilizing effect of the cooling period and obtain the percentage of lethal heat effective at center of can up to any moment during the heating, the areas beneath the lethality heating curve only are obtained up to four different points along this curve. For this solution, we shall assume the same points as those previously considered (from which the cooling curves are drawn). Steps 16 and 17, above are replaced by the following 2 steps:

16a. Form table 21-4, following plan of table 21-3:

TABLE 21-4

AREAS BENEATH LETHALITY HEATING CURVE ONLY, AND THEIR INTERPRETATION IN TERMS OF STERILIZATION

Designation of area on lethality curve	Time on lethality heating curve to which the area corresponds [minutes]	Area in small squares	Area in sterilization units [Equal to area in small squares (column 3) divided by number of small squares in <i>F</i> times sterilization unit area]	Per cent sterilization
JU'KJ	20	159	$0.0132\left(=\frac{159}{12,000}\right)$	1.32
JU'V'MJ	40	1,518	$0.1265\left(=\frac{1,518}{12,000}\right)$	12.65
JU'V'W'PJ	80	5,766	$0.4800\left(=\frac{5,766}{12,000}\right)$	48.00
JU'V'W'Y'RJ	140	14,388	$1.1990\left(=\frac{14,388}{12,000}\right)$	119.90

17a. Plot a curve—per cent sterilization against time—using data given in the second and fifth columns of table 21-4. This is curve EG' on chart 9. The intersection of this curve with the horizontal line representing 100 per cent (point XXIh on curve EG') marks the length of time the process must go to complete sterilization during the heating period only—without considering the sterilizing effect of the cooling period. This is 126.2 minutes. The corresponding point on lethality curve, JU'V'W'Y, also, is marked XXIh.

## APPENDIX

### SOLUTIONS IN TABULAR FORM







SLOUTION IN TABULAR FORM—PROBLEM I-A TO VI-B, INCLUSIVE

Small italic letters placed as exponents indicate notes inserted between steps in the solutions.  
Small numerals placed below the lines indicate the steps in the solutions.

SPECIFICATIONS:

SOLUTIONS:

PROBLEM	PROD- UCT	SIZE CAN	<i>z</i>	<i>F</i>	<i>RT</i>	<i>IT</i>	<i>CW</i>	<i>j</i>	<i>RT<sub>a</sub></i>	<i>IT<sub>a</sub></i>	<i>B<sub>a</sub></i>	<i>x'</i>	<i>CT'</i>	FIND:	<i>z</i>	Index Number	<i>f<sub>h</sub></i>	<i>I<sub>a</sub></i>	<i>jI<sub>a</sub></i>	<i>B<sup>r</sup><sub>ka</sub></i>	<i>B<sup>r</sup><sub>a</sub></i>	<i>B<sub>a</sub></i>	<i>B<sub>ka</sub></i>	<i>g<sub>a</sub></i>	<i>(m+g)<sub>a</sub></i>	$\left(\frac{f_h}{U_a}\right)_{130}$	$\left(\frac{f_h}{U_a}\right)_{180}$	$\frac{f_h}{U_a}$	<i>T<sub>a</sub></i>	<i>f<sub>ha</sub>T<sub>a</sub></i>	<i>U<sub>a</sub></i>	<i>F<sub>ia</sub></i>	<i>F<sub>i</sub></i>	<i>F</i>	<i>U</i>	$\frac{f_h}{U}$	<i>m+g</i>	<i>g<sub>130</sub></i>	<i>g<sub>180</sub></i>	<i>g</i>	<i>T</i>	<i>f<sub>h</sub>T</i>	<i>I</i>	<i>jI</i>	<i>g'</i>		
I-A.....	Corn	2	18	15	244	185	70	1.41						<i>B<sub>B</sub></i>		19.5 <sub>1</sub>	62 <sub>2</sub>																2.18 <sub>3</sub>		32.8 <sub>4</sub>	1.89 <sup>a</sup> <sub>5</sub>	174 <sub>6</sub>	1.92 <sub>7</sub>	1.80 <sub>7</sub>	1.82 <sub>7</sub>			59 <sub>8</sub>	83.19 <sub>9</sub>			
I-B.....	Peas	10	18.5	15	244	140	70	1.41						<i>B<sub>B</sub></i>		1.3 <sub>1</sub>	13 <sub>2</sub>																2.10 <sub>3</sub>		31.5 <sub>4</sub>	0.412 <sup>a</sup> <sub>5</sub>	174 <sub>7</sub>				1.769 <sub>8</sub>	22.997 <sub>9</sub>	104 <sub>10</sub>	146.64 <sub>11</sub>			
II-A.....	Corn	2	18		250	185	70	1.41	244		102.5			<i>B<sub>B</sub></i>		<sup>a</sup> 19.5 <sub>1</sub>	62 <sub>2</sub>	59 <sub>3</sub>	83.19 <sub>4</sub>	2.915 <sub>5</sub>	180.5 <sup>a</sup> <sub>6</sub>	78 <sub>7</sub>	1.26 <sub>8</sub>	1.82 <sub>9</sub>	174 <sub>10</sub>	1.80 <sub>11</sub>	1.90 <sub>11</sub>	1.88 <sub>11</sub>			32.98 <sub>12</sub>	2.18 <sub>13</sub>	1.00 <sub>13</sub>	15.1 <sup>d</sup> <sub>14</sub>	15.1 <sub>15</sub>	4.11 <sup>e/g</sup> <sub>16</sub>	180 <sub>17</sub>			4.63 <sub>18</sub>		65 <sub>19</sub>	91.65 <sub>20</sub>				
II-B.....	Peas	10			240	140	70	1.41	244		49.5			<i>B<sub>B</sub></i>		<sup>a</sup> 18 <sub>1</sub>	1.3 <sub>2</sub>	13 <sub>3</sub>	104 <sub>4</sub>	146.64 <sub>5</sub>	3.160 <sub>6</sub>	41.0 <sup>b</sup> <sub>7</sub>			174 <sub>9</sub>					1.756 <sub>10</sub>	22.828 <sub>11</sub>	31.3 <sub>12</sub>	2.18 <sub>13</sub>	3.61 <sub>13</sub>	14.4 <sup>cd</sup> <sub>14</sub>	52 <sup>e</sup> <sub>15</sub>		170 <sub>17</sub>			1.758 <sub>18</sub>	22.854 <sup>f</sup> <sub>19</sub>	100 <sub>20</sub>	141.00 <sub>21</sub>			
III.....	Corn	2			250	160				185	80			<i>B<sub>B</sub></i>		19.5 <sub>1</sub>	62 <sub>2</sub>																									90 <sub>3</sub>					
IV.....	Corn	10			250	190		1.41					235	<i>x'</i>		19.5 <sub>1</sub>	195 <sub>2</sub>																									60 <sub>3</sub>	84.6 <sub>4</sub>	15 <sub>5</sub>			
V.....	Corn	10			250	190		1.41				160		<i>CT'</i>		19.5 <sub>1</sub>	195 <sub>2</sub>																									60 <sub>3</sub>	84.6 <sub>4</sub>				
VI-A.....	Corn	10	18	13	250	170	70	1.41				110		<i>P'<sub>e</sub></i> and <i>P'</i>		19.5 <sub>1</sub>	195 <sub>2</sub>																										80 <sub>3</sub>	112.8 <sup>b</sup> <sub>4</sub>			
VI-B.....	Peas	2	18	18	255	160	70	1.41				15		<i>P'<sub>e</sub></i> < .1 and <i>P'</i> < .1		1.3 <sub>1</sub>	4.15 <sub>2</sub>																										95 <sub>3</sub>	134.0 <sup>b</sup> <sub>4</sub>			

SOLUTIONS (Concluded):

PROBLEM	$B''_k$	$B_k$	$B_k B$	$B''$	$I_a$	$B''_{ko}$	$B''_{koa}$	$B''_{ko}-B''_{koa}$	$f_h(B''_{ko}-B''_{koa})$	$B_B$	$\frac{x'}{f_h}$	$B'_k$	$\frac{x'}{f_h}$	$x'$	$g'$	$CT'$	$m+g$	$Y'_{220}$	$Z'$	$Y'$	$Y'_{220.1}$	$Z'_{.1}$	$Y'_{.1}$	$B'_{<.1}$	$F_i$	$U$	$\frac{B'_{<.1}}{U}$	$\frac{f_h}{F}$	$A'_e$	$P'_e$	$\rho'$	$A'$	$P'$	$\frac{f_h Y'_{.1}}{F Y'_{.1}}$	$A'_e<.1$	$P'_e<.1$	$\rho_{.1}$	$\frac{f_h Y'_{.1}}{F \rho_{.1}}$	$A'<.1$	$P'<.1$							
I-A.....	2.915 <sub>10</sub>	1.26 <sub>10</sub>	1.655 <sub>11</sub>							102.5 <sub>12</sub>																																					
I-B.....	3.160 <sub>12</sub>			41.0 <sub>13</sub>						49.5 <sub>14</sub>																																					
II-A.....	2.96 <sub>21</sub>	1.66 <sub>21</sub>	1.30 <sub>22</sub>							80.6 <sub>23</sub>																																					
II-B.....	3.15 <sub>22</sub>			41.0 <sub>23</sub>						70.1 <sub>24</sub>																																					
III.....					65 <sub>4</sub>	2.95 <sub>5</sub>	2.815 <sub>5</sub>	0.135 <sub>6</sub>	8.4 <sub>7</sub>	88.4 <sub>8</sub>																																					
IV.....	2.927 <sub>6</sub>											2.179 <sub>6</sub>	0.748 <sub>7</sub>	146 <sub>8</sub>																																	
V.....	2.927 <sub>5</sub>										0.82 <sub>6</sub>	2.107 <sup>a</sup> <sub>7</sub>		12.8 <sub>8</sub>	237.2 <sub>9</sub>																																
VI-A.....	3.06 <sub>5</sub>										0.565 <sub>6</sub>	2.495 <sup>c</sup> <sub>7</sub>		31.0 <sub>8</sub>		180 <sub>10</sub>	0.0000323 <sub>11</sub>	46.4 <sub>12</sub>	0.0015 <sub>13</sub>								15.0 <sub>14</sub>	0.0225 <sub>15</sub>	2.25 <sup>d</sup> <sub>16</sub>	0.518 <sub>16a</sub>	0.0435 <sub>16a</sub>	4.35 <sub>17a</sub>															
VI-B.....	3.128 <sub>5</sub>										3.615 <sub>6</sub>	−0.487 <sup>c</sup> <sub>7</sub>				185 <sub>9</sub>				0.0353 <sub>10</sub>	87.6 <sub>11</sub>	3.092 <sub>12</sub>	−2.02 <sub>13</sub>	0.532 <sub>14</sub>	9.6 <sub>15</sub>	−0.211 <sub>16</sub>	0.23 <sub>17</sub>							0.711 <sub>18</sub>	0.922 <sub>19</sub>	92.2 <sup>d</sup> <sub>20</sub>	0.946 <sub>16a</sub>	0.751 <sub>17a</sub>	0.962 <sub>18a</sub>	96.2 <sub>19a</sub>							



Small italic letters placed as exponents indicate notes inserted between steps in the solutions. Small numerals placed below the lines indicate the steps in the solutions.

SOLUTIONS:

[illegible]

SOLUTIONS (Continued):

SOLUTIONS (Concluded):







Small italic letters placed as exponents indicate notes inserted between steps in the solutions. Small numerals placed below the lines indicate the steps in the solutions.

SPECIFICATIONS:																	SOLUTIONS:																										
PROBLEM	PROD-UCT	SIZE CAN	<i>z</i>	<i>F</i>	<i>RT</i>	<i>x'</i> <sub>1A</sub>	<i>CT'</i> <sub>1A</sub>	<i>f</i> <sub>1</sub>	<i>f</i> <sub>2</sub>	<i>IT</i>	<i>j</i>	<i>IT</i> <sub>2</sub>	<i>B</i> <sub>1A2</sub>	<i>x'</i> <sub>1A</sub>	<i>x'</i> <sub>1B</sub>	<i>CT'</i> <sub>1A</sub>	<i>CT'</i> <sub>1B</sub>	FIND:	<i>g'</i> <sub>1A</sub>	<i>I</i> <sub>2</sub>	<i>jI</i> <sub>2</sub>	<i>I</i>	<i>jI</i>	<i>g'</i> <sub>1A</sub>	<i>B'</i> <sub>1A</sub>	<i>x'</i> <sub>1A</sub> <i>f</i> <sub>1A</sub>	<i>B'</i> <sub>1A2</sub>	<i>x'</i> <sub>1A</sub> <i>f</i> <sub>1A</sub>	<i>g'</i> <sub>1A</sub>	<i>B'</i> <sub>1A2</sub>	<i>B'</i> <sub>1A2</sub>	<i>B'</i> <sub>1A</sub> — <i>B'</i> <sub>1A2</sub>	<i>f</i> <sub>1A</sub> ( <i>B'</i> <sub>1A2</sub> — <i>B'</i> <sub>1A2</sub> )	<i>B'</i> <sub>1A2</sub>	<i>B'</i> <sub>1A</sub>	<i>B'</i> <sub>1A2</sub> — <i>B'</i> <sub>1A2</sub>	<i>f</i> <sub>1A</sub> ( <i>B'</i> <sub>1A2</sub> — <i>B'</i> <sub>1A2</sub> )	<i>f</i> <sub>2</sub> ( <i>B'</i> <sub>1A2</sub> — <i>B'</i> <sub>1A2</sub> )	<i>B'</i> <sub>1A</sub> — <i>B'</i> <sub>1A2</sub>	<i>f</i> <sub>2</sub> ( <i>B'</i> <sub>1A</sub> — <i>B'</i> <sub>1A2</sub> )			
IX-C	X	5			260		250	15	10	200	1.41	165	42					<i>B</i> <sub>1A</sub>	95 <sub>2</sub>		60 <sub>1</sub>										2.978 <sub>5</sub>	2.778 <sub>5</sub>	—0.200 <sub>4</sub>	—3.0 <sub>5</sub>									
IX-D	W	5			250		192	21	38	200	1.41	160	56					<i>B</i> <sub>1A</sub>	58 <sub>1</sub>	90 <sub>2</sub>	126.9 <sub>3</sub>	50 <sub>4</sub>	70.5 <sub>5</sub>				2.765 <sub>6</sub>							3.103 <sub>6</sub>	2.848 <sub>6</sub>	—0.338 <sub>7</sub>	—7.098 <sub>8</sub>			0.083 <sub>9</sub>	3.154 <sub>10</sub>		
IX-E	W	5			255		192	21	38	160	1.41	200	45					<i>B</i> <sub>1A</sub>	63 <sub>1</sub>	55 <sub>2</sub>	77.6 <sub>3</sub>	95 <sub>4</sub>	134.0 <sub>5</sub>				2.800 <sub>6</sub>							2.890 <sub>6</sub>	3.126 <sub>6</sub>	—0.090 <sub>7</sub>				—3.42 <sub>8</sub>	0.326 <sub>9</sub>		
X-A	W	2			245	8		6	22.7	160	1.41			3	10			<i>CT'</i> <sub>1A</sub> and <i>CT'</i> <sub>1B</sub>				*85 <sub>1</sub>	119.8 <sub>2</sub>		3.077 <sub>3</sub>	1.33 <sub>4</sub>	1.75 <sub>5</sub>			5.65 <sub>6</sub>													
X-B	W	2			245		239.35	6	22.7	160	1.41			5	45			<i>CT'</i> <sub>1A</sub> and <i>CT'</i> <sub>1B</sub>				*85 <sub>1</sub>	119.8 <sub>2</sub>	5.65 <sub>3</sub>	3.08 <sub>4</sub>		1.75 <sub>5</sub>	1.33 <sub>6</sub>															
XI-A	X	2			260	17.87		15	10	150	1.41					243	253	<i>x'</i> <sub>1A</sub> and <i>x'</i> <sub>1B</sub>				*110 <sub>1</sub>	155.1 <sub>2</sub>		3.191 <sub>3</sub>	1.191 <sub>4</sub>	2.000 <sub>5</sub>			10.0 <sub>6</sub>													
XI-B	X	5			260		250	15	10	150	1.41					200	259.5	<i>x</i> <sub>1A</sub> ' and <i>x</i> <sub>1B</sub>				*110 <sub>1</sub>	155.1 <sub>2</sub>	10.0 <sub>3</sub>	3.191 <sub>4</sub>		2.000 <sub>5</sub>	1.191 <sub>6</sub>															
XII-A	W	2	18	15	260	8		6	22.7	160	1.41				48			<i>P'</i> <sub>1A2</sub> and <i>P'</i> <sub>1B2</sub>				*100 <sub>1</sub>	141.0 <sub>2</sub>		3.148 <sub>3</sub>	1.333 <sub>4</sub>	1.815 <sub>5</sub>			6.54 <sub>6</sub>													
XII-B	W	2	18	15	230	8		6	22.7	160	1.41				48			<i>P'</i> <sub>1A2</sub> <.1 and <i>P'</i> <sub>1B2</sub> <.1				*170 <sub>1</sub>	98.7 <sub>2</sub>		2.994 <sub>3</sub>	1.333 <sub>4</sub>	1.661 <sub>5</sub>			4.62 <sub>6</sub>													

SOLUTIONS (Continued):

PROBLEM	$f_{A1}(B'_{1AA}-B''_{1AA})+f_1(B''_{1A}-B'_{1AA})$	$f_{A1}(B''_{1A}-B'_{1AA})$	$f_2(B'_{1AA}-B''_{1AA})+f_{A1}(B''_{1A}-B'_{1AA})$	$B_{BA}$	$\sphericalangle T'_{1A}$	$x'_{1A}$	$\frac{x'_{A1}}{f_{A1}}$	$g'_{A1}$	$B'_{1AA}$	$g'_{A1}$	$CT_{A1}$	$x'_{A2}-x'_{1A}$	$\frac{x'_{A2}-x'_{1A}}{f_2}$	$\frac{x'_{A1}}{f_{A1}}$	$x'_{A1}$	$g'_{A1}$	$B'_{1A2}$	$g'_{A2}$	$CT'_{A2}$	$B'_{1AA}-B'_{1A2}$	$f_2(B'_{1AA}-B'_{1A2})$	$x'_{A2}$	$m+g$	$Y'_{220\ A}$	$Y_{220\ A2}$	$Z_{1A}$ (= $Z_{A2}$ )	$Y_{220\ A2.1}$	$\frac{Z_{1A}}{(\sphericalangle Z_{A2.1})}$	$Y'_{1A}$	$Y_{A2}$	$Y_{A2.1}$	$F_4$			
IX-C				39.0 <sub>5</sub>																															
IX-D	-3.944 <sub>11</sub>			52.1 <sub>12</sub>																															
IX-E		6.85 <sub>10</sub>	3.43 <sub>11</sub>	48.4 <sub>12</sub>																															
X-A					139.35 <sub>7</sub>	0.50 <sub>8</sub>		2.58 <sub>9</sub>	38.00 <sub>10</sub>	207.00 <sub>11</sub>	2 <sub>12</sub>	0.088 <sub>13</sub>					1.66 <sub>14</sub>	4.6 <sub>15</sub>	241.4 <sub>16</sub>																
X-B						8 <sub>6</sub>	0.833 <sub>7</sub>	2.25 <sub>8</sub>	17.7 <sub>9</sub>	227.3 <sub>10</sub>	37 <sub>11</sub>	1.63 <sub>12</sub>					0.11 <sub>13</sub>	0.13 <sub>14</sub>	244.87 <sub>15</sub>																
XI-A					150.0 <sub>7</sub>			17 <sub>8</sub>	2.230 <sub>9</sub>				0.961 <sub>10</sub>	14.4 <sub>11</sub>	7.0 <sub>12</sub>	1.842 <sub>13</sub>				0.158 <sub>14</sub>	1.58 <sub>15</sub>	19.5 <sub>16</sub>													
XI-B						17.87 <sub>6</sub>		60 <sub>7</sub>	2.776 <sub>8</sub>				0.415 <sub>9</sub>	6.2 <sub>10</sub>	0.5 <sub>11</sub>	0.700 <sub>12</sub>				1.300 <sub>13</sub>	13.00 <sub>14</sub>	30.9 <sub>15</sub>													
XII-A					253.46 <sub>7</sub>							40 <sub>8</sub>	1.761 <sub>9</sub>				0.054 <sub>10</sub>	0.112 <sub>11</sub>	259.89 <sub>12</sub>				190 <sub>14</sub>	0.00272 <sub>15</sub>	0.0342 <sub>16</sub>	166.0 <sub>17</sub>			0.451 <sub>17</sub>	5.677 <sub>18</sub>					
XII-B					225.38 <sub>7</sub>							40 <sub>8</sub>	1.761 <sub>9</sub>				-0.100 <sub>10</sub>						160 <sub>12</sub>	0.00434 <sub>13</sub>			0.0353 <sub>15</sub>	3.61 <sub>16</sub>	0.0157 <sub>17</sub>		0.1274 <sub>18</sub>	12.9 <sub>17</sub>			

SOLUTIONS (Continued):

PROBLEM	$U$	$B'_{A2} < .1$	$\frac{B'_{A2} < .1}{U}$	$f_{A1}Y'_{A1}$	$Y_{A2}-Y'_{A1}$	$f_2(Y_{A2}-Y'_{A1})$	$f_{A1}Y'_{A1}+f_2(Y_{A2}-Y'_{A1})$	$A'_{A2}$	$P'_{A2}$	$\rho_{A2}$	$\frac{Y'_{A2}}{\rho_{A2}}$	$Y_{A2} .1-Y'_{A1}$	$f_2(Y_{A2} .1-Y'_{A1})$	$f_{A1}Y'_{A1}+f_2(Y_{A2} .1-Y'_{A1})$	$\frac{f_{A1}Y'_{A1}+f_2(Y_{A2} .1-Y'_{A1})}{F}$	$A'_{A2} < .1$	$P'_{A2} < .1$	$\rho_{A2} .1$	$\frac{Y_{A2} .1}{\rho_{A2} .1}$	$\frac{g'_{A1}}{g'_{A2}}$	$\frac{g'_{A1}}{g'_{A2}} < .1$	$\log \frac{g'_{A1}}{g'_{A2}}$	$\log \frac{g'_{A1}}{g'_{A2}} < .1$	$\frac{f_{A1}}{f_2}$	$\frac{f_{A1}}{f_2} \log \frac{g'_{A1}}{g'_{A2}}$	$\frac{f_{A1}}{f_2} \log \frac{g'_{A1}}{g'_{A2}} < .1$	$10 \frac{f_{A1}}{f_2} \log \frac{g'_{A1}}{g'_{A2}}$	$10 \frac{f_{A1}}{f_2} \log \frac{g'_{A1}}{g'_{A2}} < .1$	
IX-C																													
IX-D																													
IX-E																													
X-A																													
X-B																													
XI-A																													
XI-B																													
XII-A				2.706 <sub>19</sub>	5.226 <sub>20</sub>	118.63 <sub>21</sub>	121.336 <sub>22</sub>	8.089 <sub>23</sub>	808.9 <sub>24</sub> <sup>a</sup>	0.9464 <sub>25a</sub>	6.00 <sub>25a</sub>									58.3 <sub>26a</sub>		1.765 <sub>27a</sub>		0.264 <sub>28a</sub>	0.465 <sub>29a</sub> <sup>Hs</sup>		4.65 <sub>30a</sub>		
XII-B	193.5 <sub>18</sub>	-2.27 <sub>19</sub>	-0.0117 <sub>20</sub>	0.0942 <sub>21</sub>								0.1117 <sub>22</sub>	2.5356 <sub>23</sub>	2.6298 <sub>24</sub>	0.1753 <sub>25</sub>	0.1870 <sub>26</sub>	18.7 <sub>27</sub> <sup>a</sup>	0.9451 <sub>28a</sub>	0.1349 <sub>29a</sub>	46.2 <sub>30a</sub>		1.665 <sub>31a</sub>	0.264 <sub>32a</sub>		0.440 <sub>33a</sub> <sup>Hs</sup>		4.4 <sub>34a</sub>		

SOLUTIONS (Concluded):

PROBLEM	$\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{11}}{f_2} \log \frac{g'_{11}}{g'_{12}} \right]$	$\log^{-1} \left[ 10 \frac{f_{11}}{f_2} \log \frac{g'_{11}}{g'_{12} < .1} \right]$	$\theta_{12}$	$\theta_{12} < .1$	$\theta_{12} Y'_{11}$	$\theta_{12} < .1 Y'_{11}$	$\frac{Y_{12}}{\rho_{12}} - \theta_{12} Y'_{11}$	$f_2 \left[ \frac{Y_{12}}{\rho_{12}} - \theta_{12} Y'_{11} \right]$	$\frac{Y_{12} .1}{\rho_{12} .1} - \theta_{12} < .1 Y'_{11}$	$f_2 \left[ \frac{Y_{12} .1}{\rho_{12} .1} - \theta_{12} < .1 Y'_{11} \right]$	$\theta_{12} f_{11} Y'_{11}$	$\theta_{12} < .1 f_{11} Y'_{11}$	$\theta_{12} f_{11} Y'_{11} + f_2 \left[ \frac{Y_{12}}{\rho_{12}} - \theta_{12} Y'_{11} \right]$	$A'_{12}$	$P'_{12}$	$\theta_{12} < .1 f_{11} Y_{11} + f_2 \left[ \frac{Y_{12} .1}{\rho_{12} .1} - \theta_{12} < .1 Y'_{11} \right]$	$\frac{\theta_{12} < .1 f_{11} Y'_{11} + f_2 \left[ \frac{Y_{12} .1}{\rho_{12} .1} - \theta_{12} < .1 Y'_{11} \right]}{F}$	$A'_{12} < .1$	$P'_{12} < .1$	
IX-C																				
IX-D																				
IX-E																				
X-A																				
X-B																				
XI-A																				
XI-B																				
XII-A	44.420 27a		1.000 28a		0.451 29a		5.549 30a	125.962 31a			2.706 32a		128.668 33a	8.578 34a	857.8 35a					
XII-B		25.130 29a		1.000 28a		0.0157 31a			0.1192 31a	2.706 31a		0.0942 34a				2.800 31a		0.1867 36a	0.1984 37a	19.84 38a

2017-2018

2017-2018

Year	Month	Day	Time	Location	Activity	Notes
2017	Jan	1	10:00	Room 101	Meeting	Initial meeting with stakeholders
2017	Jan	2	10:00	Room 101	Meeting	Follow-up meeting with stakeholders
2017	Jan	3	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	4	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	5	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	6	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	7	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	8	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	9	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	10	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders

Year	Month	Day	Time	Location	Activity	Notes
2017	Jan	11	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	12	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	13	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	14	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	15	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	16	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	17	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	18	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	19	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders
2017	Jan	20	10:00	Room 101	Meeting	Meeting with stakeholders

Small italic letters placed as exponents indicate notes inserted between steps in the solutions. Small numerals placed below the lines indicate the steps in the solutions.

SPECIFICATIONS:

PROBLEM	PROD-UCT	SIZE CAN	$z$	$F$	$RT_1$	$RT_2$	$z'_b$	$CT'_b$	$IT$	$CW$	$j$	$RT_a$	$BB_a$	FINSD	$z$	Index Number	$f_h$	$I_a$	$jI_a$	$B'^{*}_{ba}$	$B'^{*}_a$	$B_a$	$B_{ba}$	$g_a$	$(m+g)_a$	$\left(\frac{f_{ba}}{U_a}\right)_{180}$	$\left(\frac{f_{ba}}{U_a}\right)_{180}$	$\frac{f_{ba}}{U_a}$	$U_a$	$F_{ia}$	$F$	$s$	$I_1$	$jI_1$	$g'_{b1}$	$B'^{*}_{b1}$	$\frac{x'_b}{f_h}$	$B'_{b1}$	$\frac{x'_b}{f_h}$	$x'_b$	$g'_{b1}$	$g'_{b2}$	$(m+g)_{12}$	$Y'^{*}_{220-01}$	$Z'_{b1}$	$Y'_{b1}$	$g'_{b2}$	$(m+g)_2$
XIII-A	Corn	10	18	15	250	242	80		180	70	1.41		$BB_2$		$^{abed}19.5$ 1 2	195 3															8	70	98.7		2.994	0.410					38.3	30.3	180	0.0000117	46.4	0.000543		172
XIII-B	Peas	10	18.5	15	260	244	10		140	70	1.41		$BB_2$		$^{abed}1.3$ 1 2	13 3															16	120	169.2		3.227	0.769	2.584				28.5	12.5	190	0.000051	142.0	0.00724		174
XIII-C	Corn	10	20	15	240	248		212	180	70	1.41		$BB_2$		$^{abed}19.5$ 1 2	195 3															8	60	84.6	28.0	2.927		2.445	0.482	93.99				170	0.00016	10.1	0.00162	36	178
XIII-D	Peas	5	18	15	250	240		220	180	70	1.41		$BB_2$		$^{abed}1.3$ 1 3	13 3															10	70	98.7	30.0	2.994		2.478	0.516	4.54				180	0.0000384	46.4	0.00178	20	170
XIV-A	Corn	10	18		250	240	80		150	70	1.41	245	160	$BB_2$		$^{abcd}19.5$ 1 2 3	195 3	65 4	91.6 5	2.963 6	577.8* 7	417.8 8	2.142 9	13.9 10	175 11	21.0 12	23.5 13	23.2 14	8.41 15	1.93 16	4.41 17	10	70	98.7		2.994 <sup>ab</sup>	0.410 19	2.584 20			38.3 21	28.3 22	180 23	0.0000117 24	46.4 25	0.000543 26		170 27
XIV-B	Peas	10			250	240		220	150	70	1.41	244	40	$BB_2$	$^{abcd}18$ 1 2	1.3 3	13 4	94 5	132.54 6	3.122 7	40.59* 8	0.59 9	0.045 10	0.111 11	174 12	0.592 13	0.598 14	0.597 15	21.78 16	2.18 17	10.01 18	10	100	141.0 <sup>ab</sup> 19	30.0 20	3.148 21	2.478 22	0.67 23	8.7 24	20.0 25	180 26	0.0000384 27	46.4 28	0.00177 29		170 30		

SOLUTIONS (Concluded):

PROBLEM	$Y'_{102.02}$	$Z'_{02}$	$Y'_{02}$	$Y'_{02}-Y'_{01}$	$\frac{Y'_{02}-Y'_{01}}{F}$	$\frac{f_A Y'_{02}-Y'_{01}}{F}$	$V$	$f$	$F_{12}$	$U_2$	$\frac{f}{U_2}$	$g_{2.100}$	$g_{2.100}$	$g_2$	$\log \frac{g'_{12}}{g_2}$	$x_c$	$BB_2$	$Y_{220.2.1}$	$Z_{2.1}$	$Y_{2.1}$	$p_{2.1}$	$\frac{Y_{2.1}}{p_{2.1}}$	$Y'_{02}-Y'_{01}-\frac{Y_{2.1}}{p_{2.1}}$	$F_{12} \left( Y'_{02}-Y'_{01}-\frac{Y_{2.1}}{p_{2.1}} \right)$	$\log g'_{02}$	$1+\log g'_{02}+F_{12} \left( Y'_{02}-Y'_{01}-\frac{Y_{2.1}}{p_{2.1}} \right)$	$f_A \left[ 1+\log g'_{02}+F_{12} \left( Y'_{02}-Y'_{01}-\frac{Y_{2.1}}{p_{2.1}} \right) \right]$	$x_c < .1$	$BB_2$
XIII-A.....	0.0000352 17	16.7 18	0.000588 19	0.000045 20	0.000003 21	0.000585 22	1.000585 23	194.9 24	2.77 25	41.6 26	4.68 <sup>b</sup> 27	5.45 28	5.18 29	5.23 30	0.764 31	149.0 32	229.0 33												
XIII-B.....	0.00004 17	19.7 18	0.01852 19	0.01128 20	0.000752 21	0.009776 22	1.009776 23	12.88 24	2.13 25	32.0 26	0.4025 <sup>b</sup> 27							0.0395 29	19.7 30	0.7782 31	0.9458 32	0.82068 33	-0.8094 34	-1.726 35	1.097 36	0.371 37	4.823 38	36.82 39	46.82 40
XIII-C.....	0.00004 17	25.2 18	0.00101 19	-0.00061 20	-0.0000406 21	-0.0078 22	0.9922 23	195.5 24	1.29 25	19.3 26	10.13 <sup>b</sup> 27			10.2 28	0.548 29	100.86 30	200.85 31												
XIII-D.....	0.000197 17	12.9 18	0.00254 19	0.00076 20	0.00005 21	0.00044 22	1.00044 23	8.8 24	3.61 25	54.1 26	0.163 <sup>b</sup> 27							0.0353 29	12.9 30	0.4554 31	0.9460 32	0.4814 33	-0.4806 34	-1.735 35	1.301 36	0.566 37	4.98 38	59.08 39	63.62 40
XIV-A.....	0.000049 29	12.9 30	0.000632 31	0.000089 32	0.00002 33	0.0039 34	1.0039 35	194.2 36	3.61 37	15.9 38	12.2 <sup>c</sup> 39	10.55 40	10.05 41	10.15 42	0.444 43	84.36 44	164.36 45												
XIV-B.....	0.000198 30	12.9 31	0.00255 32	0.00078 33	0.000078 34	0.00101 35	1.00101 36	13.0 37	3.61 38	36.1 39	0.365 <sup>c</sup> 40							0.0353 42	12.9 43	0.4554 44	0.9460 45	0.4814 46	-0.4806 47	-1.735 48	1.301 49	0.566 50	7.36 51	43.46 52	52.16 53



Date		Time		Location		Remarks	
10/10/20	10:00	10:15	10:30	10:45	11:00	11:15	11:30
10/10/20	11:45	12:00	12:15	12:30	12:45	13:00	13:15
10/10/20	14:00	14:15	14:30	14:45	15:00	15:15	15:30
10/10/20	16:00	16:15	16:30	16:45	17:00	17:15	17:30
10/10/20	18:00	18:15	18:30	18:45	19:00	19:15	19:30
10/10/20	20:00	20:15	20:30	20:45	21:00	21:15	21:30
10/10/20	22:00	22:15	22:30	22:45	23:00	23:15	23:30
10/10/20	24:00	24:15	24:30	24:45	25:00	25:15	25:30

Date		Time		Location		Remarks	
10/10/20	10:00	10:15	10:30	10:45	11:00	11:15	11:30
10/10/20	11:45	12:00	12:15	12:30	12:45	13:00	13:15
10/10/20	14:00	14:15	14:30	14:45	15:00	15:15	15:30
10/10/20	16:00	16:15	16:30	16:45	17:00	17:15	17:30
10/10/20	18:00	18:15	18:30	18:45	19:00	19:15	19:30
10/10/20	20:00	20:15	20:30	20:45	21:00	21:15	21:30
10/10/20	22:00	22:15	22:30	22:45	23:00	23:15	23:30
10/10/20	24:00	24:15	24:30	24:45	25:00	25:15	25:30

Date		Time		Location		Remarks	
10/10/20	10:00	10:15	10:30	10:45	11:00	11:15	11:30
10/10/20	11:45	12:00	12:15	12:30	12:45	13:00	13:15
10/10/20	14:00	14:15	14:30	14:45	15:00	15:15	15:30
10/10/20	16:00	16:15	16:30	16:45	17:00	17:15	17:30
10/10/20	18:00	18:15	18:30	18:45	19:00	19:15	19:30
10/10/20	20:00	20:15	20:30	20:45	21:00	21:15	21:30
10/10/20	22:00	22:15	22:30	22:45	23:00	23:15	23:30
10/10/20	24:00	24:15	24:30	24:45	25:00	25:15	25:30



SOLUTIONS IN TABULAR FORM—PROBLEMS XVII-A TO XIX-B<sup>b</sup> INCLUSIVE

Small italic letters placed as exponents indicate notes inserted between steps in the solutions. Small numerals placed below the lines indicate the steps in the solutions.

SPECIFICATIONS:

SOLUTIONS:

SPECIFICATIONS.															SOLUTIONS.																				
PROBLEM	PROD- UCT	SIZE CAN	<i>z</i>	<i>F</i>	<i>RT</i> <sub>1</sub>	<i>RT</i> <sub>2</sub>	<i>x</i> <sub><i>b</i></sub>	<i>CT</i> <sub><i>b</i></sub>	<i>IT</i>	<i>CW</i>	<i>j</i>	<i>x</i> <sub>1</sub>	<i>x</i> <sub>2</sub>	<i>CT</i> <sub>1</sub>	<i>CT</i> <sub>2</sub>	FIND:	Index Number	<i>f</i> <sub><i>h</i></sub>	<i>I</i> <sub>1</sub>	<i>jI</i> <sub>1</sub>	<i>g</i> <sub><i>b</i>1</sub>	<i>B</i> <sup><i>r</i></sup> <sub><i>k</i>1</sub>	$\frac{x'_b}{f_h}$	<i>B</i> <sub><i>kb</i>1</sub>	<i>B</i> <sup><i>r</i></sup> <sub><i>k</i>1</sub> − <i>B</i> <sub><i>kb</i>1</sub>	<i>x</i> <sub><i>b</i></sub>	<i>g</i> <sub><i>b</i>1</sub>	<i>CT</i> <sub><i>b</i></sub>	$\frac{x'_1}{f_h}$	<i>g</i> <sub>1</sub>	<i>B</i> <sub><i>k</i>1</sub>	<i>g</i> <sub>1</sub>	$\dot{C}T'_1$	<i>B</i> <sup><i>r</i></sup> <sub><i>k</i>1</sub> − <i>B</i> <sub><i>k</i>1</sub>	
XVII-A.....	Corn	2			250	240		236	180		1.41	25	60			<i>CT</i> <sub>1</sub> and <i>CT</i> <sub>2</sub>	<sup>a</sup> 19.5 1	62 2	70 3	98.7 4	14 5	2.994 6		2.148 6	0.846 7	52.5 <sup>b</sup> 8				0.403 9		2.591 10	39.2 11	210.8 12	
XVII-B.....	Peas	2			250	240	4		170		1.41	3	11			<i>CT</i> <sub>1</sub> and <i>CT</i> <sub>2</sub>	<sup>a</sup> 1.3 1	4.2 2	80 3	112.8 4		3.063 5	0.952 6	2.111 7			12.85 8	237.15 <sup>b</sup> 9		0.714 10		2.349 11	22.3 12	227.7 13	
XVIII-A.....	Corn	2			250	240		236	180		1.41			211	237	<i>x</i> <sub>1</sub> and <i>x</i> <sub>2</sub>	<sup>a</sup> 19.5 1	62 2	70 3	98.7 4	14 5	2.994 6		2.148 6	0.846 7	52.45 <sup>b</sup> 8					39 9	2.59 10			0.404 11
XVIII-B.....	Peas	2			250	240	4		170		1.41			228	239.9	<i>x</i> <sub>1</sub> and <i>x</i> <sub>2</sub>	<sup>a</sup> 1.3 1	4.2 2	80 3	112.8 4		3.063 5	0.952 6	2.111 7			12.85 8	237.15 <sup>b</sup> 9			22 10	2.343 11			0.72 12
XIX-A.....	Corn	2	18	15	250	240	52.5		180	70	1.41		60			<i>P</i> <sub><i>c</i>2</sub> and <i>P</i> <sub>2</sub>	<sup>a</sup> b19.5 1	62 2	70 3	98.7 4		2.994 <sup>c</sup> 5	0.847 6	2.147 7			14.0 <sup>d</sup> 8								
XIX-B.....	Peas	10	18	18	255	240	8		160	70	1.41		45			<i>P</i> <sub><i>c</i>2</sub> <.1 and <i>P</i> <sub>2</sub> <.1	<sup>a</sup> b1.3 1	13 2	95 3	134.0 4		3.127 <sup>c</sup> 5	0.616 6	2.511 7			32.2 <sup>d</sup> 8								

SOLUTIONS (Continued):

PROBLEM	$x'_1$	$x'_2-x'_b$	$\frac{x'_2-x'_b}{f_h}$	$s$	$g'_b$	$g'_2$	$B'_{kb2}$	$B''_{k2}$	$g'_2$	$CT'_2$	$B'_{kb2}-B'_{k2}$	$x'_2-x'_b$	$x'_2$	$B'_2<.1$	$(m+g)_1$	$Y'_{220\ b1}$	$Z_{b1}$	$Y'_{b1}$	$(m+g)_2$	$Y'_{220\ b2}$	$Y_{220\ 2}$	$Z'_{b2}$ ( $=Z_2$ )	$Y_{220\ 2\ .1}$	$Z'_{b2}$ ( $=Z_{2\ .1}$ )	$Y'_{b2}$	$Y_2$	$Y_{2\ .1}$
XVII-A.....		7.5 13	0.121 14	10 15	4.0 16		1.60 17	1.479 <sup>c</sup> 18	3.01 19	236.99 20																	
XVII-B.....		7.0 14	1.667 15	10 16	2.85 17		1.453 18	-0.214 <sup>c</sup> 19		240 20																	
XVIII-A.....	25.05 12			10 13	4.0 14	3.0 15	1.60 16	1.476 16			0.124 17	7.69 18	60.14 19														
XVIII-B.....	3.02 13			10 14	2.85 15	0.1 16	1.453 17	0 17			1.453 18	6.1 19	10.1 20														
XIX-A.....		7.5 9	0.121 10	10 11	4.0 12		1.60 13	1.479 <sup>f</sup> 14	3.01 15	236.99 <sup>g</sup> 16					180 18	0.000595 19	46.4 20	0.02781 21	170 22	0.00507 23	0.00665 23	12.9 24			0.06540 25	0.08578 26	
XIX-B.....		37.0 9	2.846 10	15 11	17.2 12		2.238 13	-0.608 <sup>f</sup> 14						-7.904 15	185 17	0.0000275 18	8.78 19	0.00241 20	170 21	0.000329 22		0.0353 22	12.9 23	0.00424 24		0.45537 25	

SOLUTIONS (Concluded):

PROBLEM	<i>F</i> <sub>12</sub>	<i>U</i> <sub>2</sub>	$\frac{B'_2 <.1}{U_2}$	$\frac{f_h}{F}$	<i>Y</i> <sub>b1</sub> − <i>Y</i> <sub>b2</sub> + <i>Y</i> <sub>2</sub>	<i>A</i> <sub><i>c</i>2</sub>	<i>P</i> <sub><i>c</i>2</sub>	$\rho_2$	$\frac{Y_2}{\rho_2}$	$Y'_{b1}-Y'_{b2}+\frac{Y_2}{\rho_2}$	<i>A</i> <sub>2</sub>	<i>P</i> <sub>2</sub>	<i>Y</i> <sub>b1</sub> − <i>Y</i> <sub>b2</sub> + <i>Y</i> <sub>2 .1</sub>	$\frac{f_h}{F}(Y'_{b1}-Y'_{b2}+Y_{2 .1})$	<i>A</i> <sub><i>c</i>2</sub> <.1	<i>P</i> <sub><i>c</i>2</sub> <.1	$\rho_2 .1$	$\frac{Y_{2 .1}}{\rho_2 .1}$	<i>Y</i> <sub>b1</sub> − <i>Y</i> <sub>b2</sub> + $\frac{Y_{2 .1}}{\rho_2 .1}$	$\frac{f_h}{F}(Y'_{b1}-Y'_{b2}+\frac{Y_{2 .1}}{\rho_2 .1})$	<i>A</i> <sub>2</sub> <.1	<i>P</i> <sub>2</sub> <.1
XVII-A.....																						
XVII-B.....																						
XVIII-A.....																						
XVIII-B.....																						
XIX-A.....				4.133 27	0.04819 28	0.1992 29	19.92 <sup>h</sup> 30	0.8405 28a	0.10206 29a	0.06447 30a	0.2665 31a	26.65 32a										
XIX-B.....	3.61 26	65.0 27	−0.1215 28	0.722 29									0.45354 30	0.3275 31	0.4490 32	44.90 <sup>h</sup> 33	0.9460 30a	0.48729 31a	0.47946 32a	0.3462 33a	0.4677 34a	46.77 35a



Small italic letters placed as exponents indicate notes inserted between steps in the solutions. Small numerals placed below the lines indicate the steps in the solutions.

SPECIFICATIONS:

SOLUTIONS:

[illegible]

## SOLUTIONS (Continued):

[illegible]

SOLUTIONS (Concluded):

PROBLEM	$\frac{Y'_{b2}-Y'_{b1}}{F}$	$\frac{f_1 Y'_{b2}-Y'_{b1}}{F}$	V	f	F <sub>12</sub>	U <sub>2</sub>	$\frac{f}{U_2}$	g <sub>2 120</sub>	g <sub>2 180</sub>	g <sub>2</sub>	log $\frac{g'_{b2}}{g_2}$	x <sub>2</sub>	Y <sub>220 2 .1</sub>	Z <sub>2 .1</sub>	Y <sub>2 .1</sub>	$\rho_{2 .1}$	Y' <sub>b2</sub> -Y' <sub>b1</sub>	$\frac{Y_{2 .1}}{\rho_{2 .1}}$	F <sub>12</sub> (Y' <sub>b2</sub> -Y' <sub>b1</sub> $\frac{Y_{2 .1}}{\rho_{2 .1}}$ )	log g' <sub>b2</sub>	1+log g <sub>22</sub> +F <sub>12</sub> $\left( Y'_{b2}-Y'_{b1}-\frac{Y_{2 .1}}{\rho_{2 .1}} \right)$	$f_b \left[ 1 + \log g'_{b2} + F_{12} \left( Y'_{b2} - Y'_{b1} - \frac{Y_{2 .1}}{\rho_{2 .1}} \right) \right]$	x <sub>c &lt; .1</sub>	B <sup>*</sup> <sub>kol</sub>	B <sup>*</sup> <sub>kol10</sub>	B <sup>*</sup> <sub>kol10</sub> -B <sup>*</sup> <sub>kol10</sub>	f <sub>b</sub> (B <sup>*</sup> <sub>kol1</sub> -B <sup>*</sup> <sub>kol10</sub> )	B <sub>B2</sub>	
XV-A	0.000015 <sub>48</sub>	0.0029 <sub>49</sub>	1.0029 <sub>50</sub>	194.4 <sub>51</sub>	3.61 <sub>52</sub>	54.6 <sub>53</sub>	3.56 <sup>1</sup> <sub>54</sub>	4.22 <sub>55</sub>	4.07 <sub>56</sub>	4.10 <sub>57</sub>	0.753 <sub>58</sub>	146.84 <sub>59</sub>																	246.84 <sub>59</sub>
XV-B	0.00000088 <sub>64</sub>	0.00001 <sub>65</sub>	1.00001 <sub>66</sub>	13.0 <sub>67</sub>	3.61 <sub>68</sub>	82.2 <sub>69</sub>	0.158 <sup>1</sup> <sub>70</sub>						0.0353 <sub>71</sub>	12.9 <sub>72</sub>	0.4554 <sub>73</sub>	0.9460 <sub>74</sub>	0.4814 <sub>75</sub>	-0.4814 <sub>76</sub>	-1.730 <sub>77</sub>	1.491 <sub>78</sub>	0.753 <sub>79</sub>	9.79 <sub>80</sub>	32.57 <sub>81</sub>						39.6 <sub>73</sub>
XVI-A	0 <sub>49</sub>	0 <sub>50</sub>	1.0 <sub>51</sub>	195.0 <sub>52</sub>	2.77 <sub>53</sub>	41.9 <sub>54</sub>	4.65 <sup>A</sup> <sub>55</sub>	5.44 <sub>56</sub>	5.18 <sub>57</sub>	5.22 <sub>58</sub>	0.899 <sub>59</sub>	175.3 <sub>60</sub>																	255.3 <sub>83</sub>
XVI-B	-0.0000092 <sub>55</sub>	-0.00012 <sub>57</sub>	0.99988 <sub>58</sub>	13.0 <sub>59</sub>	1.00 <sub>60</sub>	22.78 <sub>61</sub>	0.5707 <sup>A</sup> <sub>62</sub>						0.0353 <sub>64</sub>	46.4 <sub>65</sub>	1.63792 <sub>66</sub>	0.9468 <sub>67</sub>	1.72995 <sub>68</sub>	-1.73016 <sub>69</sub>	-1.730 <sub>70</sub>	1.535 <sub>71</sub>	0.805 <sub>72</sub>	10.47 <sub>73</sub>	33.25 <sub>74</sub>						40.3 <sub>75</sub>
XVI-C																								2.777 <sub>5</sub>	2.954 <sub>8</sub>	-0.177 <sub>6</sub>	-2.3 <sub>7</sub>		39.7 <sub>8</sub>

## TABLE Z





TABLE Z  
Index Numbers and *j*-Values

Product	Still Process Index No.	<i>j</i>	Product	Still Process Index No.	<i>j</i>
Apples:			Beets:		
water			cut		
20% syrup			small		
40% syrup			sliced		
Apricots:			Blackberries:		
water			water		
20% syrup			20% syrup		
40% syrup			40% syrup		
Artichokes			Blueberries:		
Asparagus:			water		
round tall			20% syrup		
Asparagus tips			40% syrup		
Beans:			Cabbage		
lima			Carrots:		
red kidney			large		
string			small		
Beans:			Catsup		
with pork			Cauliflower		
tomato sauce			Celery		
plain sauce			Cherries:		
Beef			water		
			20% syrup		
			40% syrup		

TABLE Z—Continued

Product	Still Process Index No.	<i>j</i>	Product	Still Process Index No.	<i>j</i>
Chicken			Gooseberries:		
			water		
			20% syrup		
			40% syrup		
Chile concarne					
			Grapefruit:		
			water		
			20% syrup		
			40% syrup		
Chili sauce					
			Grapes:		
			water		
			20% syrup		
			40% syrup		
Cider					
			Herring		
Clam chowder					
			Hominy		
			pearl		
			lye		
			milk		
Clams					
			Lawtonberries:		
Cocoanut			water		
shredded			20% syrup		
in pieces			40% syrup		
Corn:			Lobster		
cream style	19.5	1.41			
whole grain					
Corned beef					
Cream					
Currants:			Loganberries:		
water			water		
20% syrup			20% syrup		
40% syrup			40% syrup		

TABLE Z—Continued

Product	Still Process Index No.	<i>j</i>	Product	Still Process Index No.	<i>j</i>
Milk: evap.			Peas	1.3	1.41
Mushrooms			Peppers		
Okra			Pimentoes		
Okra and tomato			Pineapple: water 20% syrup 40% syrup		
Olives			Plum pudding		
Onions: large small			Plums: water 20% syrup 40% syrup		
Oysters			Potted meat		
Parsnips: large small			Prunes: water 20% syrup 40% syrup		
Peaches: water 20% syrup 40% syrup			Pumpkin		
Pears: water 20% syrup 40% syrup			Radish with spaghetti		



TABLE Z—Continued

Product	Still Process Index No.	<i>j</i>	Product	Still Process Index No.	<i>j</i>
Raspberries:			Sprouts		
water					
20% syrup			Squash		
40% syrup					
Rhubarb:			Strawberries:		
water			water		
20% syrup			20% syrup		
40% syrup			40% syrup		
Roast beef			Succotash		
Salmon			Sweet potatoes		
Sardines			Tomatoes		
Sauerkraut			Tomato paste		
Shrimp:			Tomato pulp		
wet					
dry—no liner			Tongue		
dry—1-piece liner					
dry—3-piece liner			Tuna fish		
Soups			Turkey		
Spaghetti			Turnips:		
Spinach			large		
			small		
			sliced		

## CHARTS AND AUXILIARY TABLES

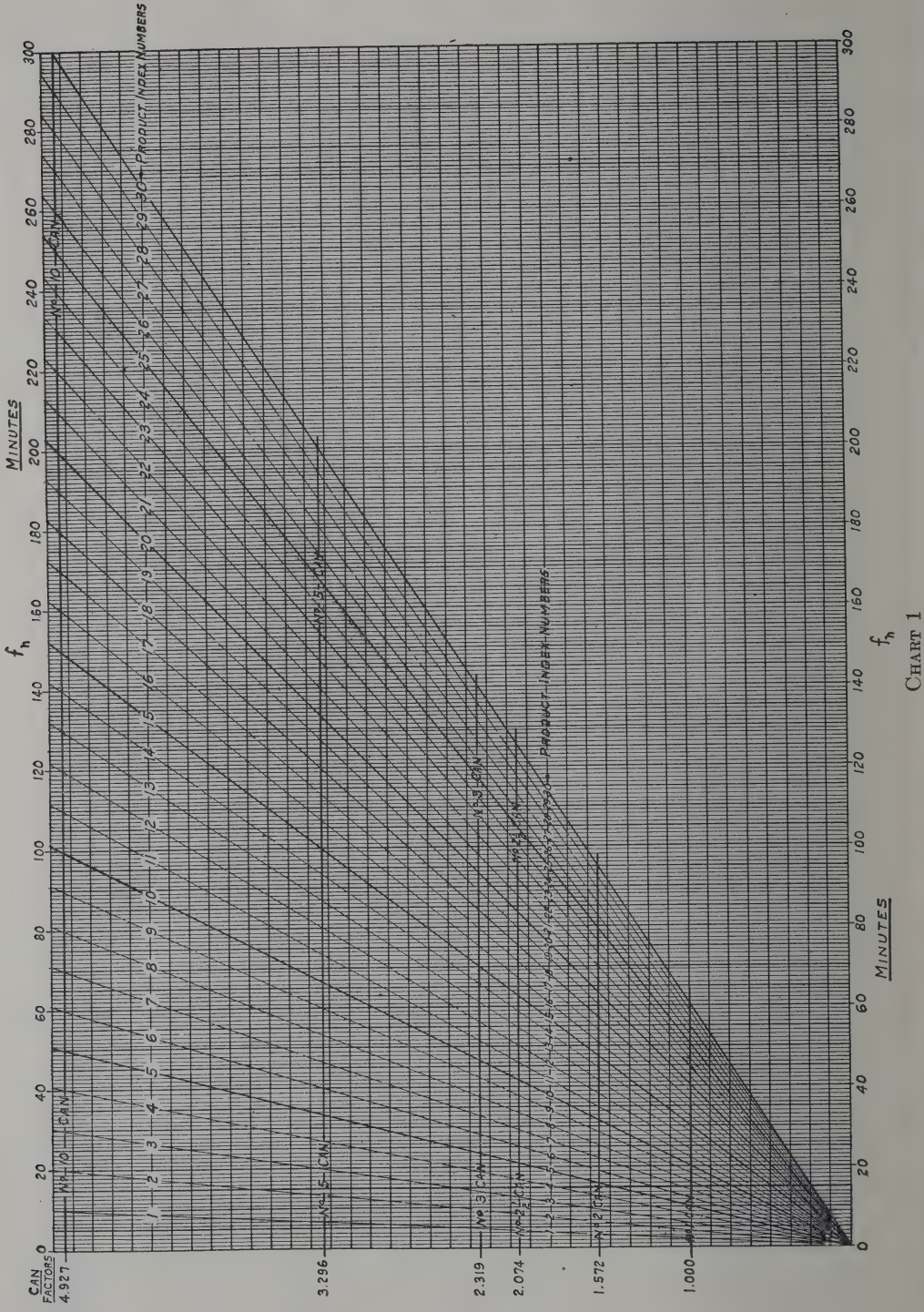


TABLE 1-C

Index number	$f_h$ (No. 1 can)	$f_h$ (No. 2 can)	$f_h$ (No. 2½ can)	$f_h$ (No. 3 can)	$f_h$ (No. 5 can)	$f_h$ (No. 10 can)
1	2.03	3.19	4.21	4.71	6.69	10
2	4.06	6.38	8.42	9.41	13.38	20
3	6.09	9.57	12.63	14.12	20.07	30
4	8.12	12.76	16.84	18.83	26.76	40
5	10.15	15.95	21.05	23.53	33.45	50
6	12.18	19.14	25.26	28.24	40.14	60
7	14.21	22.33	29.47	32.95	46.83	70
8	16.24	25.52	33.68	37.65	53.52	80
9	18.27	28.71	37.88	42.36	60.21	90
10	20.30	31.91	42.09	47.07	66.90	100
11	22.33	35.10	46.30	51.77	73.59	110
12	24.36	38.28	50.51	56.48	80.28	120
13	26.38	41.48	54.72	61.19	86.96	130
14	28.41	44.67	58.93	65.89	93.65	140
15	30.44	47.86	63.14	70.60	100.34	150
16	32.47	51.05	67.35	75.31	107.03	160
17	34.50	54.24	71.56	80.01	113.72	170
18	36.53	57.43	75.77	84.72	120.41	180
19	38.56	60.62	79.98	89.43	127.10	190
20	40.59	63.81	84.19	94.13	133.79	200
21	42.62	67.00	88.40	98.84	140.48	210
22	44.65	70.19	92.61	103.55	147.17	220
23	46.68	73.38	96.82	108.25	153.86	230
24	48.71	76.57	101.03	112.96	160.55	240
25	50.74	79.76	105.24	117.67	167.24	250
26	52.77	82.95	109.44	122.37	173.93	260
27	54.80	86.14	113.65	127.08	180.62	270
28	56.83	89.33	117.86	131.78	187.31	280
29	58.86	92.52	122.07	136.49	194.00	290
30	60.89	95.72	126.28	141.20	200.69	300





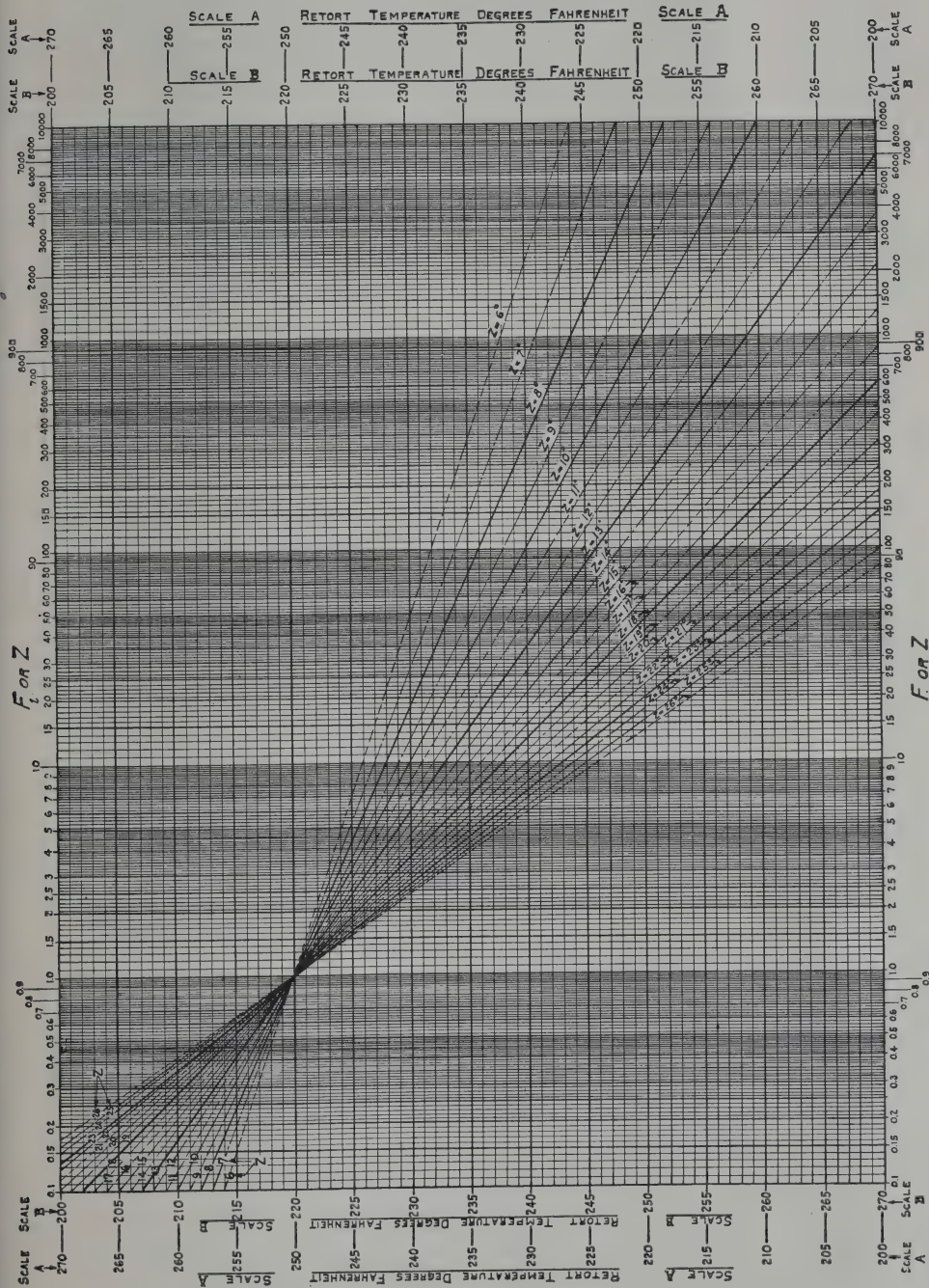


CHART 2

TABLE 2-C

Temperature (Degrees Fahrenheit)		$F_i$ or $Z$							
Scale A	Scale B	$z=26$	$z=25$	$z=24$	$z=23$	$z=22$	$z=21$	$z=20$	
.....	180	0.0289	0.0252	0.0215	0.0182	0.0154	0.0125	0.0100	
.....	185	0.0451	0.0398	0.0348	0.0301	0.0257	0.0215	0.0178	
.....	190	0.0702	0.0631	0.0562	0.0496	0.0433	0.0373	0.0316	
.....	195	0.1093	0.1000	0.0909	0.0819	0.0731	0.0645	0.0562	
.....	200	0.1701	0.1585	0.1468	0.1350	0.1233	0.1116	0.1000	
268	202	0.2031	0.1905	0.1778	0.1649	0.1520	0.1390	0.1259	
266	204	0.2425	0.2291	0.2154	0.2015	0.1874	0.1730	0.1585	
265	205	0.2649	0.2522	0.2371	0.2227	0.2081	0.1931	0.1778	
264	206	0.2894	0.2754	0.2610	0.2461	0.2310	0.2154	0.1995	
262	208	0.3455	0.3311	0.3161	0.3007	0.2848	0.2683	0.2512	
260	210	0.4125	0.3981	0.3831	0.3674	0.3512	0.3340	0.3162	
258	212	0.4924	0.4786	0.4642	0.4489	0.4329	0.4160	0.3981	
256	214	0.5878	0.5754	0.5623	0.5484	0.5336	0.5179	0.5012	
255	215	0.6422	0.6310	0.6190	0.6062	0.5926	0.5780	0.5623	
254	216	0.7017	0.6918	0.6813	0.6701	0.6579	0.6449	0.6310	
252	218	0.8377	0.8317	0.8254	0.8186	0.8111	0.8031	0.7943	
250	220	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	
248	222	1.194	1.202	1.211	1.222	1.233	1.245	1.259	
246	224	1.425	1.445	1.468	1.493	1.520	1.551	1.585	
245	225	1.557	1.585	1.616	1.650	1.688	1.730	1.778	
244	226	1.701	1.738	1.778	1.823	1.874	1.931	1.995	
242	228	2.031	2.089	2.154	2.228	2.310	2.404	2.512	

240	230	2.424	2.522	2.610	2.721	2.848	2.994	3.162
238	232	2.885	3.020	3.161	3.325	3.511	3.728	3.981
236	234	3.455	3.631	3.831	4.063	4.328	4.642	5.012
235	235	3.775	3.981	4.217	4.490	4.806	5.179	5.623
234	236	4.125	4.365	4.642	4.963	5.336	5.780	6.310
232	238	4.924	5.248	5.623	6.064	6.579	7.197	7.943
230	240	5.878	6.310	6.813	7.408	8.111	8.962	10.000
228	242	7.017	7.586	8.254	9.050	10.000	11.16	12.59
226	244	8.376	9.120	10.000	11.06	12.33	13.90	15.85
225	245	9.152	10.000	11.01	12.22	13.69	15.51	17.78
224	246	10.000	10.96	12.11	13.50	15.20	17.30	19.95
222	248	11.94	13.18	14.68	16.50	18.74	21.54	25.12
220	250	14.25	15.85	17.78	20.16	23.10	26.83	31.62
218	252	17.01	19.05	21.54	24.62	28.48	33.40	39.81
216	254	20.31	22.91	26.10	30.08	35.11	41.60	50.12
215	255	22.19	25.12	28.73	33.25	38.98	46.42	56.23
214	256	24.24	27.54	31.61	36.75	43.28	51.80	63.10
212	258	28.85	33.11	38.31	44.90	53.36	64.50	79.43
210	260	34.55	39.81	46.42	54.85	65.79	80.31	100.00
208	262	41.25	47.86	56.23	67.02	81.11	100.00	125.9
206	264	49.24	56.54	68.13	81.88	100.00	124.5	158.5
205	265	53.79	63.10	74.99	90.50	111.0	139.0	177.8
204	266	58.78	69.18	82.54	100.00	123.3	155.1	199.5
202	268	70.17	83.17	100.00	122.2	152.0	193.1	251.2
200	270	83.76	100.00	121.1	149.3	187.4	240.4	316.2
195	.....	130.4	158.5	195.7	246.2	316.2	416.0	562.3
190	.....	203.1	252.2	316.1	406.3	533.6	719.7	1,000.0
185	.....	316.2	398.1	510.9	670.2	900.4	1,245.	1,778.
180	.....	492.4	631.0	825.4	1,105.	1,520.	2,154.	3,162.



TABLE 2-C—Continued

Temperature (Degrees Fahrenheit)		$F_i$ or $Z$						
Scale A	Scale B	$z=19$	$z=18$	$z=17$	$z=16$	$z=15$	$z=14$	$z=13$
	180	0.0078	0.0060	0.0044	0.0036	0.0022	0.0014	0.0008
	185	0.0144	0.0114	0.0087	0.0065	0.0046	0.0036	0.0020
	190	0.0264	0.0215	0.0172	0.0133	0.0100	0.0072	0.0049
	195	0.0483	0.0408	0.0328	0.0274	0.0220	0.0164	0.0119
270	200	0.0907	0.0774	0.0666	0.0562	0.0464	0.0373	0.0289
268	202	0.1129	0.1000	0.0873	0.0750	0.0631	0.0518	0.0412
266	204	0.1439	0.1292	0.1145	0.1000	0.0681	0.0721	0.0588
265	205	0.1624	0.1468	0.1311	0.1155	0.1000	0.0848	0.0702
264	206	0.1833	0.1668	0.1502	0.1334	0.1166	0.1000	0.0838
262	208	0.2336	0.2154	0.1969	0.1778	0.1585	0.1390	0.1194
260	210	0.2976	0.2783	0.2581	0.2114	0.2154	0.1931	0.1701
258	212	0.3793	0.3594	0.3384	0.3162	0.2929	0.2683	0.2424
256	214	0.4833	0.4642	0.4437	0.4217	0.3981	0.3737	0.3455
255	215	0.5456	0.5275	0.5080	0.4870	0.4642	0.4393	0.4124
254	216	0.6159	0.5995	0.5817	0.5623	0.5411	0.5179	0.4923
252	218	0.7848	0.7743	0.7627	0.7499	0.7356	0.7210	0.7016
250	220	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
248	222	1.274	1.292	1.311	1.334	1.359	1.390	1.425
246	224	1.624	1.668	1.719	1.778	1.848	1.931	2.031
245	225	1.833	1.896	1.968	2.054	2.154	2.276	2.424
244	226	2.117	2.154	2.254	2.371	2.522	2.683	2.895
242	228	2.637	2.783	2.955	3.612	3.414	3.727	4.124

240	230	3.360	3.594	3.874	4.732	4.642	5.179	5.879
238	232	4.281	4.642	5.080	5.623	6.310	7.210	8.376
236	234	5.455	5.995	6.660	7.499	8.577	10.000	11.94
235	235	6.158	6.813	7.626	8.660	10.000	11.79	14.25
234	236	6.951	7.743	8.732	10.000	11.66	13.90	17.01
232	238	8.858	10.000	11.45	13.34	15.18	19.31	24.24
230	240	11.29	12.92	15.01	17.78	21.54	26.83	34.55
228	242	14.39	16.68	19.68	23.71	29.29	37.27	49.24
226	244	18.33	21.54	25.81	36.12	39.81	51.79	70.17
225	245	21.17	24.48	29.55	36.52	46.42	61.03	83.76
224	246	23.36	27.83	33.84	47.32	54.11	72.10	100.00
222	248	29.76	35.94	44.36	56.23	73.56	100.00	142.5
220	250	37.93	46.42	58.17	74.99	100.00	139.0	203.1
218	252	48.32	59.92	76.26	100.00	135.9	193.1	289.4
216	254	61.59	77.43	100.00	133.4	184.8	268.3	412.4
215	255	69.51	87.99	114.5	154.0	215.4	361.2	492.3
214	256	78.48	100.00	131.1	177.8	252.2	372.7	587.8
212	258	100.00	129.2	171.9	237.1	341.4	517.9	837.6
210	260	127.4	166.8	225.4	361.2	464.2	721.0	1,194.
208	262	162.4	215.4	295.5	473.2	631.0	1,000.0	1,701.
206	264	211.7	278.3	387.4	562.3	857.7	1,390.	2,424.
205	265	233.6	316.2	443.6	649.4	1,000.0	1,638.	2,894.
204	266	263.7	359.4	508.0	749.9	1,166.	1,931.	3,455.
202	268	336.0	464.2	666.0	1,000.0	1,518.	2,683.	4,923.
200	270	428.1	599.5	873.2	1,334.	2,154.	3,727.	7,016.
195	.....	748.8	1,136.	1,719.	2,738.	4,642.	8,482.	17,010.
190	.....	1,439.	2,154.	3,384.	5,623.	10,000.	19,310.	41,240.
185	.....	2,637.	4,084.	6,660.	11,550.	21,540.	43,930.	100,000.
180	.....	4,832.	7,743.	13,110.	23,710.	46,420.	100,000.	242,400.

TABLE 2-C—Concluded

Temperature (Degrees Fahrenheit)		$F_i$ or $Z$						
Scale A	Scale B	$z = 12$	$z = 11$	$z = 10$	$z = 9$	$z = 8$	$z = 7$	$z = 6$
.....	180	0.0005	0.0002	0.0001	0.00004	0.00001	0.000002	0.0000002
.....	185	0.0068	0.0007	0.0004	0.00013	0.00004	0.00001	0.0000015
.....	190	0.0036	0.0019	0.0010	0.0005	0.0002	0.00005	0.00001
.....	195	0.0083	0.0053	0.0040	0.0017	0.0007	0.0003	0.00007
.....	200	0.0215	0.0152	0.0100	0.0060	0.0036	0.0014	0.0005
270								
268	202	0.0316	0.0231	0.0159	0.0100	0.0056	0.0027	0.0010
266	204	0.0464	0.0351	0.0252	0.0167	0.0100	0.0052	0.0022
265	205	0.0562	0.0433	0.0316	0.0215	0.0133	0.0072	0.0036
264	206	0.0681	0.0534	0.0398	0.0278	0.0178	0.0100	0.0046
262	208	0.1000	0.0811	0.0631	0.0464	0.0361	0.0193	0.0100
260	210	0.1468	0.1233	0.1000	0.0774	0.0562	0.0373	0.0215
258	212	0.2154	0.1874	0.1585	0.1292	0.1000	0.0720	0.0464
256	214	0.3612	0.2848	0.2522	0.2154	0.1778	0.1391	0.1000
255	215	0.3831	0.3511	0.3162	0.2783	0.2371	0.1931	0.1468
254	216	0.4642	0.4329	0.3981	0.3594	0.3612	0.2683	0.2154
252	218	0.6813	0.6579	0.6310	0.5995	0.5623	0.5179	0.4642
250	220	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000	1.0000
248	222	1.468	1.520	1.585	1.668	1.778	1.931	2.154
246	224	2.154	2.310	2.522	2.783	3.612	3.728	4.642
245	225	2.610	2.848	3.162	3.594	4.217	5.179	6.813
244	226	3.612	3.511	3.981	4.642	5.623	7.197	10.000
242	228	4.642	5.337	6.310	7.743	10.000	13.91	21.54

240	230	6.813	8.111	10.000	12.92	17.78	26.83	46.42
238	232	10.000	12.33	15.85	21.54	36.12	51.79	100.00
236	234	14.68	18.74	25.22	35.94	56.23	100.00	215.4
235	235	17.78	23.10	31.62	46.42	74.99	139.1	361.2
234	236	21.54	28.48	39.81	59.95	100.00	193.1	464.2
232	238	36.12	43.29	63.10	100.00	177.8	372.8	1,000.0
230	240	46.42	65.79	100.00	166.8	361.2	719.7	2,154.
228	242	68.13	100.00	158.5	278.3	562.3	1,391.	4,642.
226	244	100.00	152.0	252.2	464.2	1,000.0	2,683.	10,000.
225	245	121.2	187.4	316.2	599.5	1,334.	3,728.	14,680.
224	246	146.8	231.0	398.1	774.3	1,778.	5,179.	21,540.
222	248	215.4	351.1	631.0	1,292.	3,612.	10,000.	46,420.
220	250	361.2	533.7	1,000.0	2,154.	5,623.	19,310.	100,000.
218	252	464.2	811.1	1,585.	3,594.	10,000.	37,280.	215,400.
216	254	681.3	1,233.	2,522.	5,995.	17,780.	71,970.	464,200.
215	255	825.4	1,520.	3,162.	7,743.	23,710.	100,000.	681,300.
214	256	1,000.0	1,874.	3,981.	10,000.	36,120.	139,100.	1,000,000.
212	258	1,468.	2,848.	6,310.	16,680.	56,230.	268,300.	2,154,000.
210	260	2,154.	4,329.	10,000.	27,830.	100,000.	517,900.	4,642,000.
208	262	3,612.	6,579.	15,850.	46,420.	177,800.	1,000,000.	10,000,000.
206	264	4,642.	10,000.	25,220.	77,430.	361,200.	1,931,000.	21,540,000.
205	265	5,623.	12,330.	31,620.	100,000.	421,700.	2,683,000.	36,120,000.
204	266	6,813.	15,200.	39,810.	129,200.	562,300.	3,728,000.	46,420,000.
202	268	10,000.	23,100.	63,100.	215,400.	1,000,000.	7,197,000.	100,000,000.
200	270	14,680.	35,110.	100,000.	359,400.	1,778,000.	13,910,000.	215,400,000.
195	.....	37,440.	100,000.	361,200.	1,292,000.	7,499,000.	71,970,000.	1,468,000,000.
190	.....	100,000.	284,800.	1,000,000.	4,642,000.	36,120,000.	373,800,000.	10,000,000,000.
185	.....	261,000.	811,100.	3,612,000.	16,680,000.	133,400,000.	1,931,000,000.	68,130,000,000.
180	.....	681,300.	2,310,000.	10,000,000.	59,950,000.	562,300,000.	10,000,000,000.	464,200,000,000.





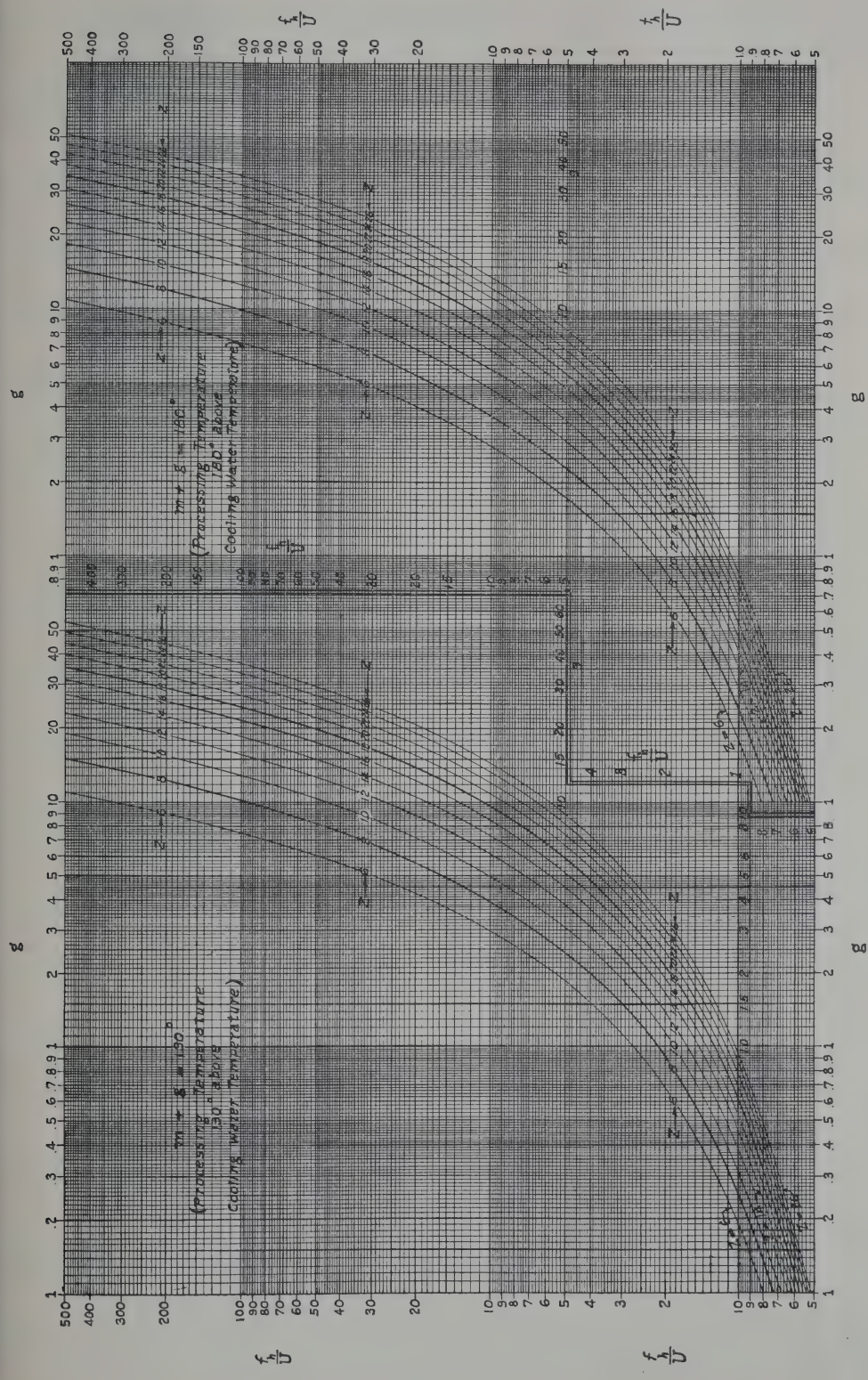


CHART 2

TABLE 3-C  
SECTION I. PART I.  
Values of  $g$  for Different Values of  $\frac{f_h}{U}$  and of  $z$   
 $m+g=130 \quad z=26$  to  $z=16$

<i>Note:</i> Each column headed “ $g$ ” represents a curve on chart 3. Each gives for one value of $z$ , the value of $g$ corresponding to each of the values of $\frac{f_h}{U}$ given in the first and last columns. The intervening columns, headed “ $\Delta_z$ ” and “ $\Delta \frac{f_h}{U}$ ” respectively give values of increments and decrements. The first gives the vertical increments for the “ $g$ ” column adjacent to which it is placed. The second gives horizontal decrements for given values of $\frac{f_h}{U}$ . For instance, in Section I, Part I the value of “ $g$ ” which heads the first “ $\Delta \frac{f_h}{U}$ ” column is the difference between the first two values in the column, “( $g=26$ )”, viz., 0.102 and 0.126. The value, 8, which heads the first “ $\Delta_z$ ” column is the difference between the first values in the two “ $g$ ” columns, “ $z=26$ ” and “ $z=24$ ”, respectively, viz., 0.102 and 0.094.																		
$\frac{f_h}{U}$	$g$ ( $z=26$ )	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta_z$	$g$ ( $z=24$ )	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta_z$	$g$ ( $z=22$ )	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta_z$	$g$ ( $z=20$ )	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta_z$	$g$ ( $z=18$ )	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta_z$	$g$ ( $z=16$ )	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\frac{f_h}{U}$
.52	0.102	24	8	0.094	21	7	0.087	18	94	0.0956	331	85	0.0871	292	115			.52
.55	0.126	45	11	0.115	41	10	0.105	37	133	0.1287	427	124	0.1163	374	124			.55
.60	0.171	58	15	0.156	53	14	0.142	48	186	0.1714	506	177	0.1537	442	168	0.1048	321	.60
.65	0.229	71	20	0.209	64	19	0.190	57	250	0.2220	620	241	0.1979	541	232	0.1369	378	.65
.70	0.300	82	27	0.273	76	26	0.247	69	32	0.284	66	32	0.252	58	241	0.1747	463	.70
.75	0.382	91	33	0.349	83	33	0.316	75	41	0.350	70	40	0.310	62	31	0.221	50	.75
.80	0.473	98	41	0.432	87	40	0.391	78	49	0.420	74	48	0.372	65	39	0.271	54	.80
.85	0.571	103	52	0.519	94	50	0.469	84	59	0.494	78	57	0.437	69	47	0.325	57	.85
.90	0.674	108	61	0.613	97	60	0.553	87	68	0.572	83	66	0.506	73	55	0.382	60	.90
.95	0.782	113	72	0.710	103	70	0.640	93							64	0.442	63	.95
1.00	0.895	591	82	0.813	536	80	0.733	483	78	0.655	431	76	0.579	381	74	0.505	333	1.00
1.25	1.486	609	137	1.349	553	133	1.216	498	130	1.086	445	126	0.960	394	122	0.838	345	1.25
1.50	2.095	611	193	1.902	559	188	1.714	507	183	1.531	455	177	1.354	403	171	1.183	351	1.50
1.75	2.706	599	245	2.461	543	240	2.221	489	235	1.986	437	229	1.757	388	223	1.534	342	1.75
2.00	3.305	576	301	3.004	524	294	2.710	474	287	2.423	426	278	2.145	378	269	1.876	331	2.00
2.25	3.881	548	353	3.528	499	344	3.184	451	335	2.849	404	326	2.523	359	316	2.207	316	2.25
2.50	4.429	522	402	4.027	476	392	3.635	430	382	3.253	386	371	2.882	343	359	2.523	301	2.50
2.75	4.951	498	448	4.503	454	438	4.065	411	426	3.639	369	414	3.225	328	401	2.824	288	2.75
3.00	5.449	474	492	4.957	436	481	4.476	399	468	4.008	361	455	3.553	322	441	3.112	282	3.00
3.25	5.923		530	5.393		518	4.875		506	4.369		494	3.875		481	3.394		3.25



0.00	0.24	0.48	0.72	0.96	1.20	1.44	1.68	1.92	2.16	2.40	2.64	2.88	3.12	3.36	3.60	3.84	4.08	4.32	4.56	4.80	5.04	5.28	5.52	5.76	6.00	6.24	6.48	6.72	6.96	7.20	7.44	7.68	7.92	8.16	8.40	8.64	8.88	9.12	9.36	9.60	9.84	10.08	10.32	10.56	10.80	11.04	11.28	11.52	11.76	12.00	12.24	12.48	12.72	12.96	13.20	13.44	13.68	13.92	14.16	14.40	14.64	14.88	15.12	15.36	15.60	15.84	16.08	16.32	16.56	16.80	17.04	17.28	17.52	17.76	18.00	18.24	18.48	18.72	18.96	19.20	19.44	19.68	19.92	20.16	20.40	20.64	20.88	21.12	21.36	21.60	21.84	22.08	22.32	22.56	22.80	23.04	23.28	23.52	23.76	24.00	24.24	24.48	24.72	24.96	25.20	25.44	25.68	25.92	26.16	26.40	26.64	26.88	27.12	27.36	27.60	27.84	28.08	28.32	28.56	28.80	29.04	29.28	29.52	29.76	30.00	30.24	30.48	30.72	30.96	31.20	31.44	31.68	31.92	32.16	32.40	32.64	32.88	33.12	33.36	33.60	33.84	34.08	34.32	34.56	34.80	35.04	35.28	35.52	35.76	36.00	36.24	36.48	36.72	36.96	37.20	37.44	37.68	37.92	38.16	38.40	38.64	38.88	39.12	39.36	39.60	39.84	40.08	40.32	40.56	40.80	41.04	41.28	41.52	41.76	42.00	42.24	42.48	42.72	42.96	43.20	43.44	43.68	43.92	44.16	44.40	44.64	44.88	45.12	45.36	45.60	45.84	46.08	46.32	46.56	46.80	47.04	47.28	47.52	47.76	48.00	48.24	48.48	48.72	48.96	49.20	49.44	49.68	49.92	50.16	50.40	50.64	50.88	51.12	51.36	51.60	51.84	52.08	52.32	52.56	52.80	53.04	53.28	53.52	53.76	54.00	54.24	54.48	54.72	54.96	55.20	55.44	55.68	55.92	56.16	56.40	56.64	56.88	57.12	57.36	57.60	57.84	58.08	58.32	58.56	58.80	59.04	59.28	59.52	59.76	60.00	60.24	60.48	60.72	60.96	61.20	61.44	61.68	61.92	62.16	62.40	62.64	62.88	63.12	63.36	63.60	63.84	64.08	64.32	64.56	64.80	65.04	65.28	65.52	65.76	66.00	66.24	66.48	66.72	66.96	67.20	67.44	67.68	67.92	68.16	68.40	68.64	68.88	69.12	69.36	69.60	69.84	70.08	70.32	70.56	70.80	71.04	71.28	71.52	71.76	72.00	72.24	72.48	72.72	72.96	73.20	73.44	73.68	73.92	74.16	74.40	74.64	74.88	75.12	75.36	75.60	75.84	76.08	76.32	76.56	76.80	77.04	77.28	77.52	77.76	78.00	78.24	78.48	78.72	78.96	79.20	79.44	79.68	79.92	80.16	80.40	80.64	80.88	81.12	81.36	81.60	81.84	82.08	82.32	82.56	82.80	83.04	83.28	83.52	83.76	84.00	84.24	84.48	84.72	84.96	85.20	85.44	85.68	85.92	86.16	86.40	86.64	86.88	87.12	87.36	87.60	87.84	88.08	88.32	88.56	88.80	89.04	89.28	89.52	89.76	90.00	90.24	90.48	90.72	90.96	91.20	91.44	91.68	91.92	92.16	92.40	92.64	92.88	93.12	93.36	93.60	93.84	94.08	94.32	94.56	94.80	95.04	95.28	95.52	95.76	96.00	96.24	96.48	96.72	96.96	97.20	97.44	97.68	97.92	98.16	98.40	98.64	98.88	99.12	99.36	99.60	99.84	100.08	100.32	100.56	100.80	101.04	101.28	101.52	101.76	102.00	102.24	102.48	102.72	102.96	103.20	103.44	103.68	103.92	104.16	104.40	104.64	104.88	105.12	105.36	105.60	105.84	106.08	106.32	106.56	106.80	107.04	107.28	107.52	107.76	108.00	108.24	108.48	108.72	108.96	109.20	109.44	109.68	109.92	110.16	110.40	110.64	110.88	111.12	111.36	111.60	111.84	112.08	112.32	112.56	112.80	113.04	113.28	113.52	113.76	114.00	114.24	114.48	114.72	114.96	115.20	115.44	115.68	115.92	116.16	116.40	116.64	116.88	117.12	117.36	117.60	117.84	118.08	118.32	118.56	118.80	119.04	119.28	119.52	119.76	120.00	120.24	120.48	120.72	120.96	121.20	121.44	121.68	121.92	122.16	122.40	122.64	122.88	123.12	123.36	123.60	123.84	124.08	124.32	124.56	124.80	125.04	125.28	125.52	125.76	126.00	126.24	126.48	126.72	126.96	127.20	127.44	127.68	127.92	128.16	128.40	128.64	128.88	129.12	129.36	129.60	129.84	130.08	130.32	130.56	130.80	131.04	131.28	131.52	131.76	132.00	132.24	132.48	132.72	132.96	133.20	133.44	133.68	133.92	134.16	134.40	134.64	134.88	135.12	135.36	135.60	135.84	136.08	136.32	136.56	136.80	137.04	137.28	137.52	137.76	138.00	138.24	138.48	138.72	138.96	139.20	139.44	139.68	139.92	140.16	140.40	140.64	140.88	141.12	141.36	141.60	141.84	142.08	142.32	142.56	142.80	143.04	143.28	143.52	143.76	144.00	144.24	144.48	144.72	144.96	145.20	145.44	145.68	145.92	146.16	146.40	146.64	146.88	147.12	147.36	147.60	147.84	148.08	148.32	148.56	148.80	149.04	149.28	149.52	149.76	150.00	150.24	150.48	150.72	150.96	151.20	151.44	151.68	151.92	152.16	152.40	152.64	152.88	153.12	153.36	153.60	153.84	154.08	154.32	154.56	154.80	155.04	155.28	155.52	155.76	156.00	156.24	156.48	156.72	156.96	157.20	157.44	157.68	157.92	158.16	158.40	158.64	158.88	159.12	159.36	159.60	159.84	160.08	160.32	160.56	160.80	161.04	161.28	161.52	161.76	162.00	162.24	162.48	162.72	162.96	163.20	163.44	163.68	163.92	164.16	164.40	164.64	164.88	165.12	165.36	165.60	165.84	166.08	166.32	166.56	166.80	167.04	167.28	167.52	167.76	168.00	168.24	168.48	168.72	168.96	169.20	169.44	169.68	169.92	170.16	170.40	170.64	170.88	171.12	171.36	171.60	171.84	172.08	172.32	172.56	172.80	173.04	173.28	173.52	173.76	174.00	174.24	174.48	174.72	174.96	175.20	175.44	175.68	175.92	176.16	176.40	176.64	176.88	177.12	177.36	177.60	177.84	178.08	178.32	178.56	178.80	179.04	179.28	179.52	179.76	180.00	180.24	180.48	180.72	180.96	181.20	181.44	181.68	181.92	182.16	182.40	182.64	182.88	183.12	183.36	183.60	183.84	184.08	184.32	184.56	184.80	185.04	185.28	185.52	185.76	186.00	186.24	186.48	186.72	186.96	187.20	187.44	187.68	187.92	188.16	188.40	188.64	188.88	189.12	189.36	189.60	189.84	190.08	190.32	190.56	190.80	191.04	191.28	191.52	191.76	192.00	192.24	192.48	192.72	192.96	193.20	193.44	193.68	193.92	194.16	194.40	194.64	194.88	195.12	195.36	195.60	195.84	196.08	196.32	196.56	196.80	197.04	197.28	197.52	197.76	198.00	198.24	198.48	198.72	198.96	199.20	199.44	199.68	199.92	200.16	200.40	200.64	200.88	201.12	201.36	201.60	201.84	202.08	202.32	202.56	202.80	203.04	203.28	203.52	203.76	204.00	204.24	204.48	204.72	204.96	205.20	205.44	205.68	205.92	206.16	206.40	206.64	206.88	207.12	207.36	207.60	207.84	208.08	208.32	208.56	208.80	209.04	209.28	209.52	209.76	210.00	210.24	210.48	210.72	210.96	211.20	211.44	211.68	211.92	212.16	212.40	212.64	212.88	213.12	213.36	213.60	213.84	214.08	214.32	214.56	214.80	215.04	215.28	215.52	215.76	216.00	216.24	216.48	216.72	216.96	217.20	217.44	217.68	217.92	218.16	218.40	218.64	218.88	219.12	219.36	219.60	219.84	220.08	220.32	220.56	220.80	221.04	221.28	221.52	221.76	222.00	222.24	222.48	222.72	222.96	223.20	223.44	223.68	223.92	224.16	224.40	224.64	224.88	225.12	225.36	225.60	225.84	226.08	226.32	226.56	226.80	227.04	227.28	227.52	227.76	228.00	228.24	228.48	228.72	228.96	229.20	229.44	229.68	229.92	230.16	230.40	230.64	230.88	231.12	231.36	231.60	231.84	232.08	232.32	232.56	232.80	233.04	233.28	233.52	233.76	234.00	234.24	234.48	234.72	234.96	235.20	235.44	235.68	235.92	236.16	236.40	236.64	236.88	237.12	237.36	237.60	237.84	238.08	238.32	238.56	238.80	239.04	239.28	239.52	239.76	240.00	240.24	240.48	240.72	240.96	241.20	241.44	241.68	241.92	242.16	242.40	242.64	242.88	243.12	243.36	243.60	243.84	244.08	244.32	244.56	244.80	245.04	245.28	245.52	245.76	246.00	246.24	246.48	246.72	246.96	247.20	247.44	247.68	247.92	248.16	248.40	248.64	248.88	249.12	249.36	249.60	249.84	250.08	250.32	250.56	250.80	251.04	251.28	251.52	251.76	252.00	252.24	252.48	252.72	252.96	253.20	253.44	253.68	253.92	254.16	254.40	254.64	254.88	255.12	255.36	255.60	255.84	256.08	256.32	256.56	256.80	257.04	257.28	257.52	257.76	258.00	258.24	258.48	258.72	258.96	259.20	259.44	259.68	259.92	260.16	260.40	260.64	260.88	261.12	261.36	261.60	261.84	262.08	262.32	262.56	262.80	263.04	263.28	263.52	263.76	264.00	264.24	264.48	264.72	264.96	265.20	265.44	265.68	265.92	266.16	266.40	266.64	266.88	267.12	267.36	267.60	267.84	268.08	268.32	268.56	268.80	269.04	269.28	269.52	269.76	270.00	270.24	270.48	270.72	270.96	271.20	271.44	271.68	271.92	272.16	272.40	272.64	272.88	273.12	273.36	273.60	273.84	274.08	274.32	274.56	274.80	275.04	275.28	275.52	275.76	276.00	276.24	276.48	276.72	276.96	27
------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	-------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	--------	----



TABLE 3-C

## SECTION I. PART II.

Values of  $g$  for Different Values of  $\frac{f_h}{U}$  and  $z$  $m+g=130 \quad z=16 \text{ to } z=6$ 

$\frac{f_h}{U}$	$\frac{g}{(z=16)}$	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta z$	$\frac{g}{(z=14)}$	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta z$	$\frac{g}{(z=12)}$	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta z$	$\frac{g}{(z=10)}$	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta z$	$\frac{g}{(z=8)}$	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\Delta z$	$\frac{g}{(z=6)}$	$\Delta \frac{f_h}{U}$	$\frac{f_h}{U}$
.52																		.52
.55																		.55
.60	0.1048	321	108	0.0940	264	142	0.1062	261	123	0.0939	194	171	0.0962	120				.60
.65	0.1369	378	165	0.1204	326	207	0.1323	297	190	0.1133	210							.65
.70	0.1747	463	217	0.153	38													.70
.75	0.221	50	30	0.191	43	29	0.1620	362	277	0.1343	297	261	0.1082	235	241	0.0841		.75
.80	0.271	54	37	0.234	46	358	0.1982	390	342	0.1640	322	323	0.1317	255	301	0.1016	175	.80
.85	0.325	57	45	0.280	49	428	0.2372	413	410	0.1962	339	390	0.1572	269	366	0.1206	190	.85
.90	0.382	60	53	0.329	51	505	0.2785	425	484	0.2301	346	460	0.1841	273	436	0.1405	199	.90
.95	0.442	63	62	0.380	54	590	0.3210	450	563	0.2647	373	533	0.2114	296	500	0.1614	209	.95
1.00	0.505	333	71	0.434	286	68	0.366	242	64	0.302	199	61	0.241	158	57	0.184	226	1.00
1.25	0.838	345	118	0.720	298	112	0.608	252	107	0.501	208	102	0.399	166	96	0.303	119	1.25
1.50	1.183	351	165	1.018	301	158	0.860	253	151	0.709	208	144	0.565	166	136	0.429	126	1.50
1.75	1.534	342	215	1.319	297	206	1.113	252	196	0.917	208	186	0.731	164	176	0.555	122	1.75
2.00	1.876	331	260	1.616	286	251	1.365	243	240	1.125	200	230	0.895	158	218	0.677	116	2.00
2.25	2.207	316	305	1.902	273	294	1.608	232	283	1.325	191	272	1.053	150	260	0.793	110	2.25
2.50	2.523	301	348	2.175	261	335	1.840	219	324	1.516	179	313	1.203	141	300	0.903	105	2.50
2.75	2.824	288	388	2.436	249	377	2.059	209	364	1.695	171	351	1.344	135	336	1.008	100	2.75
3.00	3.112	282	427	2.685	241	417	2.268	201	402	1.866	165	387	1.479	130	371	1.108	96	3.00
3.25	3.394	266	468	2.926	231	457	2.469	194	438	2.031	159	422	1.609	126	405	1.204	92	3.25
3.50	3.660	257	503	3.157	220	484	2.663	188	473	2.190	154	455	1.735	121	439	1.296	90	3.50
3.75	3.917	246	540	3.377	213	526	2.851	183	507	2.344	151	488	1.856	117	470	1.386	87	3.75
4.00	4.163	489	573	3.590	418	556	3.034	348	539	2.495	280	522	1.973	217	500	1.473	155	4.00
4.50	4.652	421	644	4.008	363	626	3.382	306	607	2.775	251	585	2.190	198	562	1.628	143	4.50
5.00	5.073		702	4.371		683	3.688		662	3.026		638	2.388		614	1.771		5.00

5.50	5.47	397	76	4.71	339	734	3.976	288	714	3.262	236	690	2.572	184	667	1.905	134	5.50
6.00	5.84	37	81	5.03	32	779	4.251	275	764	3.487	225	739	2.748	176	716	2.032	127	6.00
6.50	6.19	35	85	5.34	31	826	4.514	263	811	3.703	216	786	2.917	169	764	2.153	121	6.50
7.00	6.53	34	89	5.64	30	873	4.767	253	856	3.911	208	832	3.079	162	809	2.270	117	7.00
7.50	6.86	33	93	5.93	29	918	5.012	245	899	4.113	202	877	3.236	157	852	2.384	114	7.50
		33			28			238			196			152			112	
8.00	7.19	60	98	6.21	52	960	5.250	437	941	4.309	357	921	3.388	283	892	2.496	210	8.00
9.00	7.79	53	106	6.73	46	1043	5.687	393	1021	4.666	324	995	3.671	259	965	2.706	194	9.00
10.00	8.32	113	113	7.19	97	1110	6.080	818	1090	4.990	676	1060	3.930	534	1030	2.900	402	10.00
12.50	9.45	92	129	8.16	80	1262	6.898	682	1232	5.666	564	1202	4.464	446	1162	3.302	328	12.50
15.00	10.37		141	8.96		1380	7.580	580	1350	6.230	470	1320	4.910		1280	3.630		15.00
		80			69									37			270	
17.50	11.17		152	9.65		149	8.16	53	146	6.70	44	142	5.28		138	3.900		17.50
20.00	11.88	71	161	10.27	62	158	8.69	90	155	7.14	74	152	5.62	34	146	4.160	260	20.00
25.00	13.10	122	177	11.33	106	174	9.59	77	171	7.88	64	167	6.21	59	162	4.590	430	25.00
30.00	14.13	103	190	12.23	90	187	10.36	65	184	8.52	54	180	6.72	51	1759	4.961	371	30.00
35.00	15.02	89	202	13.00	77	199	11.01		195	9.06		191	7.15	43	1869	5.281	320	35.00
		77			67			57			47			37			280	
40.00	15.79	69	212	13.67	59	209	11.58	50	205	9.53	41	201	7.52		1959	5.561		40.00
45.00	16.48	60	222	14.26	53	218	12.08	46	214	9.94	39	209	7.85	33	2041	5.809	248	45.00
50.00	17.08	103	229	14.79	89	225	12.54	75	221	10.33	62	217	8.16	31	2121	6.039	230	50.00
60.00	18.11	88	243	15.68	76	239	13.29	64	234	10.95	52	229	8.66	50	2243	6.417	378	60.00
70.00	18.99		255	16.44		251	13.93		246	11.47		241	9.06	40	2360	6.700	283	70.00
		73			65			56			45			34			250	
80.00	19.72	69	263	17.09	58	260	14.49	49	257	11.92	40	252	9.40		245	6.95		80.00
90.00	20.41	65	274	17.67	54	269	14.98	43	264	12.32	35	261	9.71	31	253	7.18	23	90.00
100.00	21.06	247	285	18.21	215	280	15.41	183	274	12.67	150	268	9.99	28	261	7.38	20	100.00
150.00	23.53	183	317	20.36	158	312	17.24	134	307	14.17	111	301	11.16	117	293	8.23	85	150.00
200.00	25.36		342	21.94		336	18.58		330	15.28		324	12.04	88	316	8.88	65	200.00
		146			126			106			87			69			51	
250.00	26.82	123	362	23.20	106	356	19.64	89	349	16.15	73	342	12.73		334	9.39	43	250.00
300.00	28.05	104	379	24.26	92	373	20.53	80	365	16.88	67	357	13.31	58	349	9.82	39	300.00
350.00	29.09	85	391	25.18	71	385	21.33	60	378	17.55	50	371	13.84	42	363	10.21	36	350.00
400.00	29.94	148	405	25.89	129	396	21.93		388	18.05	92	379	14.26	75	369	10.57	59	400.00
500.00	31.42		424	27.18		415	23.03	110	406	18.97		396	15.01		385	11.16		500.00











5.50	5.22	380	713	4.507	328	691	3.816	280	672	3.144	230	652	2.492	180	623	1.869	133	5.50
6.00	5.58	36	768	4.812	305	747	4.065	263	706	3.359	215	698	2.661	169	668	1.993	124	6.00
6.50	5.91	33	810	5.100	288	783	4.317	247	755	3.562	193	741	2.821	160	711	2.110	117	6.50
7.00	6.23	32	854	5.376	276	816	4.560	233	805	3.755	186	781	2.974	153	753	2.221	111	7.00
7.50	6.54	31	898	5.642	266	859	4.783	223	842	3.941	186	821	3.120	146	793	2.327	106	7.50
		29			258			217			179			140			103	
8.00	6.83		93	5.90		90	5.00		88	4.12		86	3.26		83	2.43		8.00
9.00	7.41	58	101	6.40	50	98	5.42	42	95	4.47	35	92	3.55	29	90	2.65	22	9.00
10.00	7.94	53	108	6.86	46	105	5.81	39	102	4.79	32	99	3.80	25	95	2.85	20	10.00
12.50	9.02	108	122	7.80	94	119	6.61	80	116	5.45	66	113	4.32	52	110	3.22	37	12.50
15.00	9.90	88	134	8.56	76	131	7.25	64	128	5.97	52	125	4.72	40	120	3.52	30	15.00
		77			67			57			47			38			28	
17.50	10.67		144	9.23		141	7.82		138	6.44		134	5.10		130	3.80		17.50
20.00	11.38	71	153	9.85	62	150	8.35	53	147	6.88	44	144	5.44	34	139	4.05	25	20.00
25.00	12.56	118	170	10.86	101	166	9.20	85	162	7.58	70	158	6.00	56	152	4.48	43	25.00
30.00	13.56	100	183	11.73	87	179	9.94	74	175	8.19	61	170	6.49	49	165	4.84	36	30.00
35.00	14.39	83	193	12.46	73	189	10.57	63	185	8.72	53	181	6.91	42	177	5.14	30	35.00
		74			64			54			44			35			26	
40.00	15.13		203	13.10		199	11.11		195	9.16		190	7.26		186	5.40		40.00
45.00	15.81	68	213	13.68	58	209	11.59	48	203	9.56	40	199	7.57	31	194	5.63	23	45.00
50.00	16.40	59	220	14.20	52	216	12.04	45	211	9.93	37	206	7.87	30	202	5.85	22	50.00
60.00	17.46	106	233	15.13	93	229	12.84	80	225	10.59	66	220	8.39	52	215	6.24	39	60.00
70.00	18.36	90	246	15.90	77	242	13.48	64	237	11.11	52	231	8.80	41	226	6.54	30	70.00
		74			64			54			45			35			25	
80.00	19.10		256	16.54		252	14.02		246	11.56		241	9.15		236	6.79		80.00
90.00	19.76	66	264	17.12	58	260	14.52	50	256	11.96	40	250	9.46	31	245	7.01	22	90.00
100.00	20.36	60	270	17.66	54	268	14.98	46	264	12.34	38	259	9.75	29	254	7.21	20	100.00
150.00	22.86	250	305	19.81	215	301	16.80	182	296	13.84	150	292	10.92	117	287	8.05	84	150.00
200.00	24.65	179	328	21.37	156	324	18.13	133	319	14.94	110	314	11.80	88	309	8.71	66	200.00
		140			122			104			86			68			49	
250.00	26.05		346	22.59		342	19.17		337	15.80		332	12.48		328	9.20		250.00
300.00	27.21	116	361	23.60	101	357	20.03	86	352	16.51	71	347	13.04	56	343	9.61	41	300.00
350.00	28.19	98	374	24.45	85	370	20.75	72	365	17.10	59	360	13.50	46	355	9.95	34	350.00
400.00	29.04	85	386	25.18	73	381	21.37	62	376	17.61	51	371	13.90	40	367	10.23	28	400.00
500.00	30.57	153	404	26.53	135	400	22.53	116	396	18.57	96	392	14.65	75	387	10.78	55	500.00

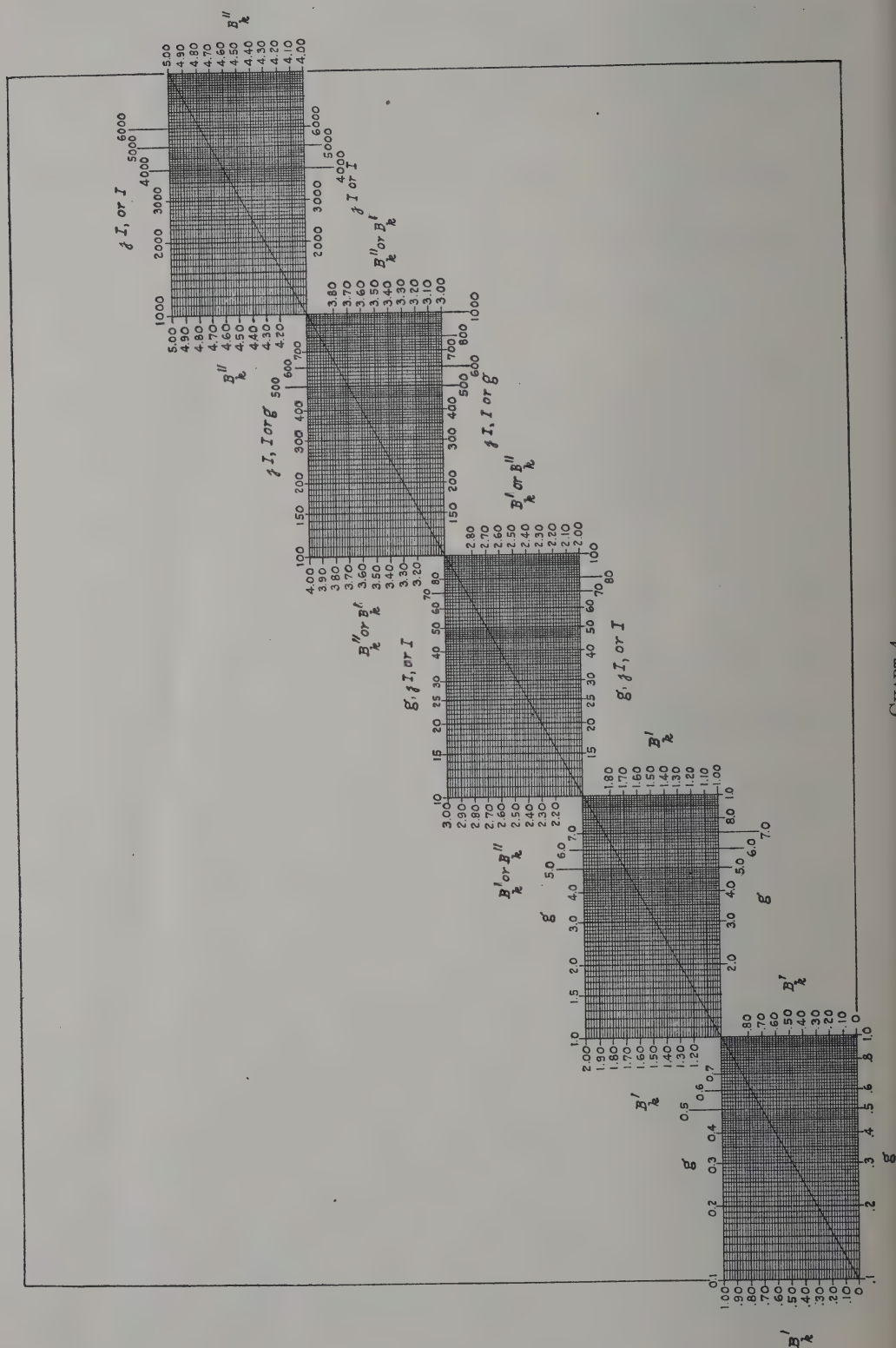
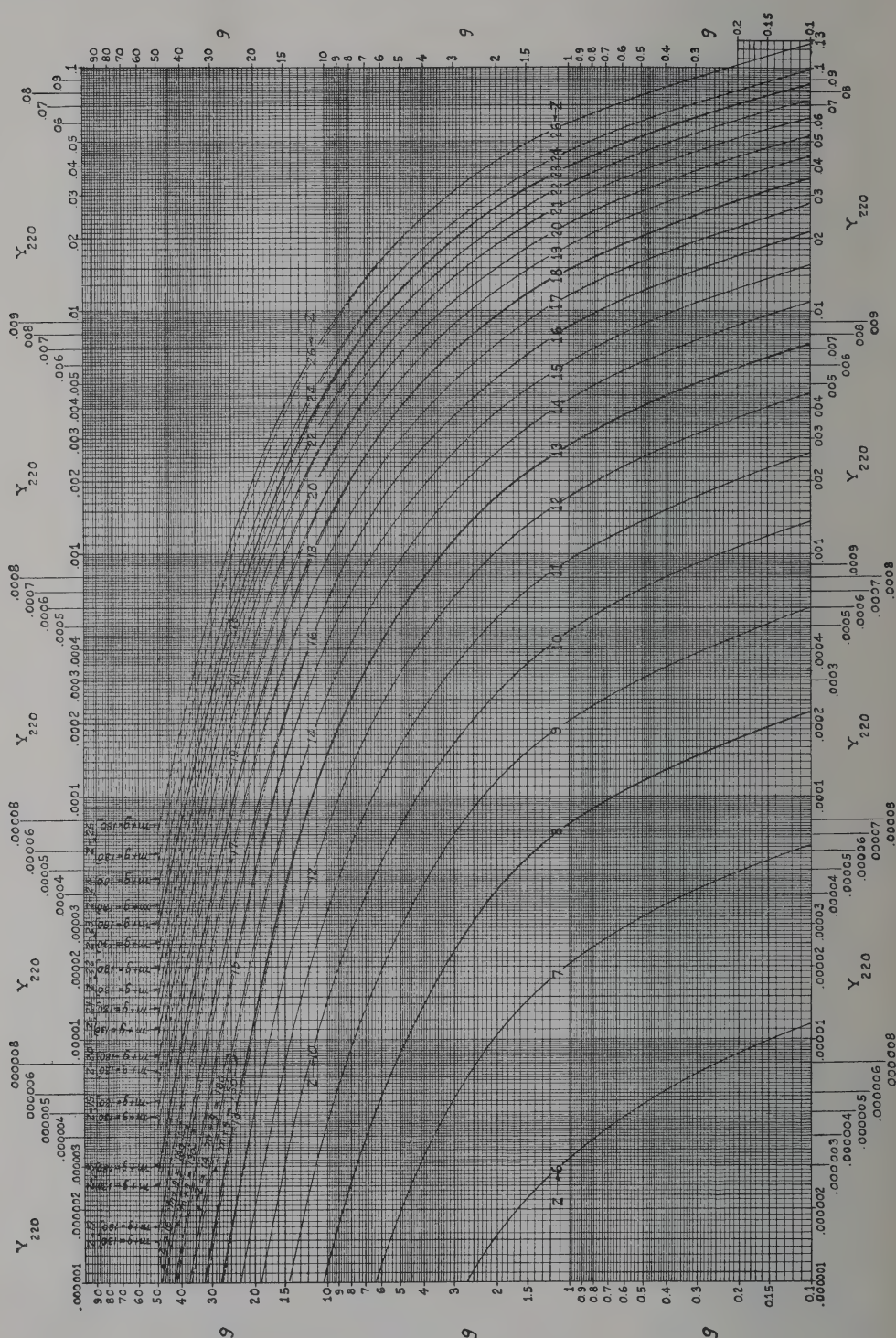


TABLE 4-C  
Values of  $B_k$  for Different Values at  $g$ .  
( $B_k = 1 + \log g$ )

$g$	$B_k$	$\Delta$	$g$	$B_k$	$\Delta$
					670
0.100	0.000		35.0	2.5441	580
0.125	0.0969	969	40.0	2.6021	511
0.150	0.1761	792	45.0	2.6532	468
0.175	0.2430	669	50.0	2.6990	514
0.200	0.3010	580	55.0	2.7404	378
		512			347
0.225	0.3522	457	60.0	2.7782	322
0.250	0.3079	414	65.0	2.8129	300
0.275	0.4393	378	70.0	2.8451	280
0.300	0.4771	670	75.0	2.8751	511
0.350	0.5441	580	80.0	2.9031	458
		511			969
0.40	0.6021	511	90.0	2.9542	792
0.45	0.6532	458	100.0	3.0000	669
0.50	0.6990	414	125.0	3.0969	580
0.55	0.7404	378	150.0	3.1761	512
0.60	0.7782	347	175.0	3.2430	457
		322			414
0.65	0.8129	300	200.0	3.3010	378
0.70	0.8451	280	225.0	3.3522	670
0.75	0.8751	263	250.0	3.3979	580
0.80	0.9031	248	275.0	3.4393	511
0.85	0.9294	458	300.0	3.4771	511
		969			580
0.90	0.9542	969	350.0	3.5441	511
1.00	1.0000	792	400.0	3.6021	458
1.25	1.0969	669	450.0	3.6532	414
1.50	1.1761	669	500.0	3.6990	378
1.75	1.2430	580	550.0	3.7404	347
		512			322
2.00	1.3010	512	600.0	3.7782	300
2.25	1.3522	457	650.0	3.8129	280
2.50	1.3979	414	700.0	3.8451	511
2.75	1.4393	378	750.0	3.8751	458
3.00	1.4771	670	800.0	3.9031	414
		580			378
3.50	1.5441	580	900.0	3.9542	347
4.00	1.6021	511	1,000.0	4.0000	322
4.50	1.6532	511	1,250.0	4.0969	300
5.00	1.6990	458	1,500.0	4.1761	280
5.50	1.7404	414	1,750.0	4.2430	511
		378			458
6.00	1.7782	347	2,000.0	4.3010	969
6.50	1.8129	322	2,250.0	4.3522	792
7.00	1.8451	300	2,500.0	4.3979	669
7.50	1.8751	280	2,750.0	4.4393	580
8.00	1.9031	511	3,000.0	4.4771	512
		458			457
9.0	1.9542	969	3,500.0	4.5441	414
10.0	2.0000	792	4,000.0	4.6021	378
12.5	2.0969	669	4,500.0	4.6532	670
15.0	2.1761	669	5,000.0	4.6990	580
17.0	2.2430	580	5,500.0	4.7404	511
		512			458
20.0	2.3010	512	6,000.0	4.7782	347
22.5	2.3522	457	6,500.00	4.8129	322
25.0	2.3979	414	7,000.0	4.8451	300
27.5	2.4393	378	7,500.0	4.8751	280
30.0	2.4771	670	8,000.0	4.9031	511
		580			458
.....	.....	.....	9,000.0	4.9542	.....
.....	.....	.....	10,000.0	5.0000	.....







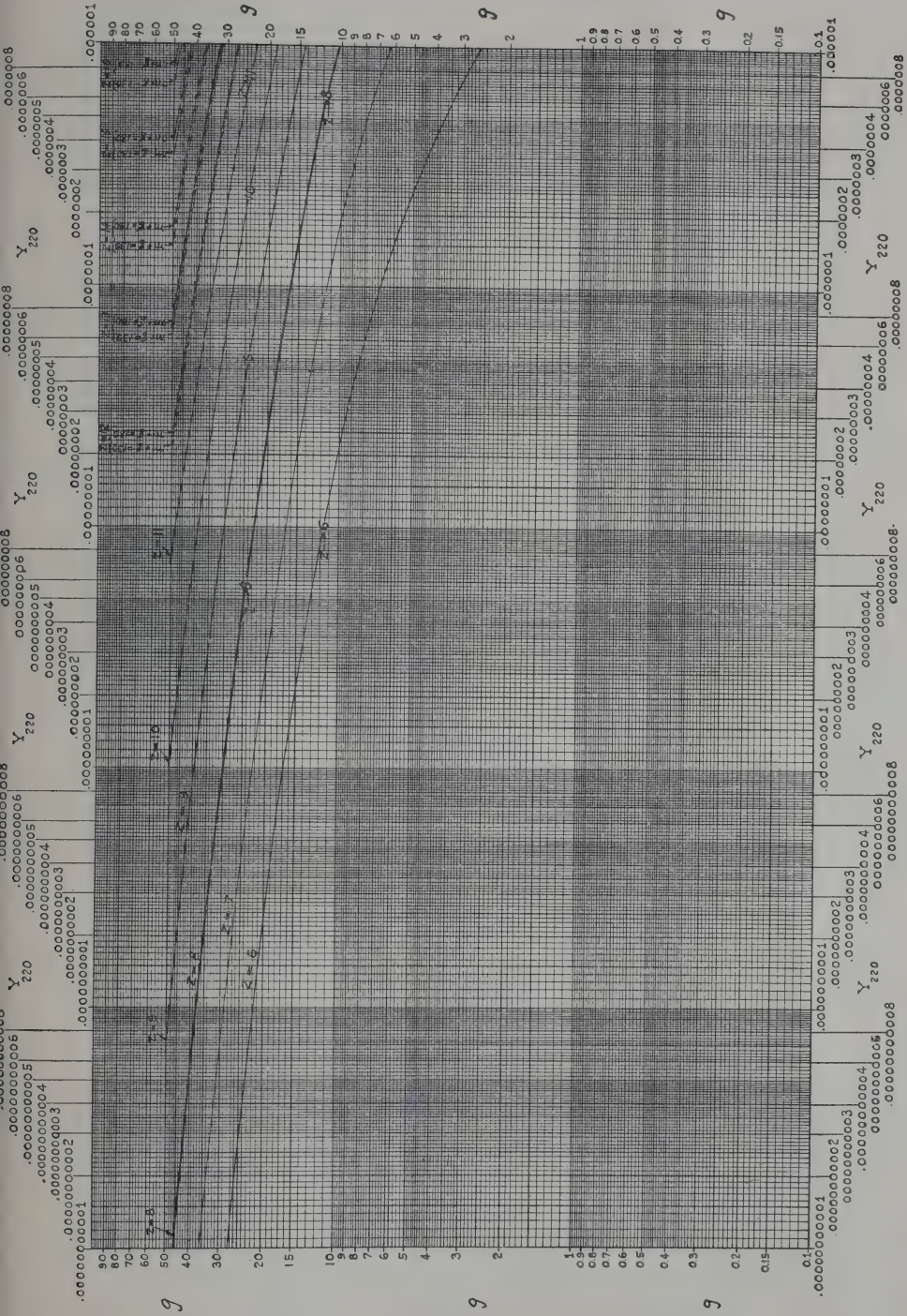


CHART 5B



NOTE ON TABLE 5-C

Each column headed " $Y_{220}$ " represents a curve on Chart 5. Each gives, for one value of  $z$ , the value of  $Y_{220}$  corresponding to each of the values of  $g$  given in the first column. The column giving the values of  $g$  is repeated at intervals through the table. The columns headed  $\Delta g$  and  $\Delta z$ , respectively, give values of decrements. Each of the former gives the vertical decrement for the " $Y_{220}$ " column adjacent to which it is placed. The latter give the horizontal decrements for  $Y_{220}$  for given values of  $g$ . Significant figures only are given in these columns since decimals are disregarded.

For example, the value "87" which heads the first " $\Delta g$ " column is the difference between the first two values in the column,  $Y_{220}$  ( $z=26$ ) viz., .1276 and .1189. The value "291" which heads the first " $\Delta z$ " column is the difference between the first values in the two " $Y_{220}$ " columns " $z=26$ " and " $z=24$ ", respectively, viz., .1276 and .0985.

As part of the heading of each " $Y_{220}$ " column from " $z=26$ " to " $z=12$ ," inclusive, the designation " $m+g=180$ ," and, to the right of this, the designation " $m+g=130$ " are given. These designations refer to the lower parts of the columns, for, in the lower values,  $Y_{220}$  varies appreciably as the value of  $m+g$  varies, whereas, in the higher values, it does not. Thus, in the lower part of the table, there are two " $Y_{220}$ " columns for each of the values of  $z$  from 26 to 12, inclusive. The first of these columns represents the condition,  $m+g=180$ , and the second represents the condition,  $m+g=130$ . To avoid confusion, the " $\Delta z$ " columns are not extended into the lower part of the table where these two " $Y_{220}$ " columns occur. The " $\Delta g$ " values are given, however.



TABLE 5-C  
Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$	$Y_{220}$ ( $z=26$ )		$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=24$ )		$\Delta g$
	$m+g=180$	$m+g=130$			$m+g=180$	$m+g=130$	
.100	.1276		87	291	.0985		59
0.125	.1189		64	263	.0926		49
0.150	.1125		54	248	.0877		39
0.175	.1071		44	233	.0838		34
0.200	.1027			223	.0804		
			36				31
0.225	.0991		31	218	.0773		24
0.250	.0960		28	211	.0749		22
0.275	.0932		25	205	.0727		19
0.300	.0907		46	199	.0708		36
0.350	.0861			189	.0672		
			35				29
0.40	.0826		31	183	.0643		24
0.45	.0795		27	174	.0619		22
0.50	.0768		25	171	.0597		20
0.55	.0743		23	166	.0577		19
0.60	.0720			162	.0558		
			22				17
0.65	.0698		20	157	.0541		15
0.70	.0678		18	152	.0526		15
0.75	.0660		16	149	.0511		13
0.80	.0644		15	146	.0498		13
0.85	.0629			144	.0485		
			14				12
0.90	.0615		27	142	.0473		22
1.00	.0588		55	137	.0451		46
1.25	.0533		47	128	.0405		38
1.50	.0486		40	119	.0367		31
1.75	.0446			110	.0336		
			35				28
2.00	.0411		32	103	.0308		25
2.25	.0379		27	96	.0283		21
2.50	.0352		24	90	.0262		18
2.75	.0328			84	.0244		
3.00	.0306		22	78	.0228		16
	$\Delta g$	$\Delta g$			$\Delta g$	$\Delta g$	
3.50	.02687	.02683	291		.02007	.02005	216
4.00	.02396	.02387	245		.01793	.01789	192
4.50	.02151	.02137	217		.01603	.01597	170
5.00	.01934	.01916	187		.01435	.01427	149
5.50	.01747	.01725	164		.01288	.01278	130
			167			129	
6.00	.01583	.01558	144		.01159	.01148	112
6.50	.01439	.01411	126		.01048	.01036	97
7.00	.01313	.01282	110		.00952	.00939	86
7.50	.01203	.01169	98		.00867	.00853	77
8.00	.01105	.01069	86		.00791	.00776	67
			88			66	
8.50	.01019	.00981	77		.00725	.00709	60
9.00	.00942	.00903	140		.00666	.00649	104
10.00	.00802	.00762	247		.00563	.00545	181
12.50	.00555	.00515	165		.00383	.00364	120
15.00	.00390	.00352	115		.00263	.00244	80
			111			81	
17.50	.00275	.00251	79		.00182	.00164	52
20.00	.00196	.00175	53		.00128	.00112	34
22.50	.00143	.00125	37		.00091	.00078	23
25.00	.00106	.00091	27		.00065	.00055	16
27.50	.00079	.00066			.00047	.00039	
			199			120	115
30.00	.000591	.000485	263		.000350	.000275	125
35.00	.000328	.000260	140		.000190	.000150	64
40.00	.000188	.000148	75		.000110	.000086	35
45.00	.000113	.000085	42		.000066	.000051	16
50.00	.000071	.000053			.000041	.000035	

TABLE 5-C—Continued  
Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=23$ )		$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=22$ )		$\Delta g$
		$m+g=180$	$m+g=130$			$m+g=180$	$m+g=130$	
.100	125	.0860		51	121	.0739		43
0.125	117	.0809		42	113	.0696		36
0.150	110	.0767		84	107	.0660		29
0.175	105	.0733		29	102	.0631		25
0.200	100	.0704		27	98	.0606		22
0.225	96	.0677		22	93	.0584		19
0.250	94	.0655		20	90	.0565		17
0.275	92	.0635		17	87	.0548		15
0.300	90	.0618		30	85	.0533		26
0.350	84	.0588		26	81	.0507		23
0.40	81	.0562		22	78	.0484		20
0.45	79	.0540		20	76	.0464		18
0.50	77	.0520		18	74	.0446		16
0.55	75	.0502		17	72	.0430		15
0.60	73	.0485		15	70	.0415		14
0.65	71	.0470		13	69	.0401		12
0.70	69	.0457		13	68	.0389		11
0.75	67	.0444		12	66	.0378		10
0.80	66	.0432		11	64	.0368		9
0.85	64	.0421		11	62	.0359		9
0.90	63	.0410		20	60	.0350		18
1.00	61	.0390		41	58	.0332		36
1.25	56	.0349		34	53	.0296		30
1.50	52	.0315		27	49	.0266		24
1.75	48	.0288		25	46	.0242		22
2.00	45	.0263		21	43	.0220		18
2.25	41	.0242		19	40	.0202		16
2.50	39	.0223		16	37	.0186		13
2.75	37	.0207		14	34	.0173		12
3.00	35	.0193		24	32	.0161		20
3.50	.....	.0169		19	28	.0141		17
4.00	.....	.0150		17	26	.0124		14
4.50	.....	.0133		15	23	.0110		12
5.00	.....	.0118		12	20	.0098		10
5.50	.....	.0106		12	18	.0088		.....
6.00	.....	$\Delta g$	$\Delta g$	.....	.....	$\Delta g$	$\Delta g$	.....
6.50	.....	.00952	.00950	93	95	.00788	.00786	79
7.00	.....	.00859	.00855	80	81	.00711	.00707	67
7.50	.....	.00779	.00774	71	72	.00646	.00640	60
8.00	.....	.00708	.00702	62	63	.00588	.00580	53
8.50	.....	.00646	.00639	56	57	.00536	.00527	48
9.00	.....	.00590	.00582	50	51	.00489	.00479	43
10.00	.....	.00540	.00531	84	85	.00447	.00436	70
12.50	.....	.00456	.00446	149	150	.00378	.00366	127
15.00	.....	.00307	.00296	99	99	.00252	.00239	82
17.50	.....	.00208	.00197	677	669	.00170	.00157	53
20.00	.....	.001403	.001301	420	410	.00116	.00104	33
22.50	.....	.000983	.000891	289	278	.00081	.00071	23
25.00	.....	.000694	.000613	199	187	.00056	.00048	15
27.50	.....	.000495	.000426	143	130	.00039	.00033	11
30.00	.....	.000352	.000296	97	85	.00027	.00022	64
35.00	.....	.000255	.000211	111	98	.000196	.000156	75
40.00	.....	.000144	.000113	62	51	.000107	.000081	37
45.00	.....	.000082	.000062	35	26	.000058	.000044	19
50.00	.....	.000047	.000036	18	10	.000033	.000025	10
50.00	.....	.000029	.000026	.....	.....	.000018	.000015	.....

TABLE 5-C—Continued  
Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=21$ )		$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=20$ )		$\Delta g$	
		$m+g=180$	$m+g=130$			$m+g=180$	$m+g=130$		
.100	109	.0630		37	101	.0529		32	
0.125	103	.0593		30	96	.0497		25	
0.150	97	.0563		24	91	.0472		20	
0.175	92	.0539		21	87	.0452		18	
0.200	88	.0518		19	84	.0434		16	
0.225	85	.0499		17	81	.0418		15	
0.250	83	.0482		15	79	.0403		13	
0.275	81	.0467		14	77	.0390		12	
0.300	80	.0453		23	75	.0378		20	
0.350	77	.0430		20	72	.0358		17	
0.40	74	.0410		18	69	.0341		15	
0.45	72	.0392		16	66	.0326		14	
0.50	70	.0376		14	64	.0312		12	
0.55	68	.0362		12	62	.0300		11	
0.60	65	.0350		12	61	.0289		10	
0.65	63	.0338		11	59	.0279		9	
0.70	62	.0327		10	57	.0270		8	
0.75	61	.0317		9	55	.0262		8	
0.80	60	.0308		8	54	.0254		7	
0.85	59	.0300		8	53	.0247		7	
0.90	58	.0292		15	52	.0240		13	
1.00	55	.0277		30	50	.0227		26	
1.25	49	.0247		26	46	.0201		21	
1.50	45	.0221		20	41	.0180		17	
1.75	41	.0201		19	38	.0163		15	
2.00	38	.0182		15	34	.0148		13	
2.25	35	.0167		13	32	.0135		11	
2.50	32	.0154		11	30	.0124		9	
2.75	30	.0143		10	28	.0115		8	
3.00	28	.0133		16	26	.0107		13	
3.50	24	.0117		14	23	.0094		12	
4.00	21	.0103		12	21	.0082		10	
4.50	19	.0091		10	19	.0072		8	
5.00	17	.0081		9	17	.0064		7	
5.50	16	.0072		75	15	.0057		60	
6.00	.....	.00645		65	135	.00510		52	
6.50	.....	.00580		56	122	.00458		46	
7.00	.....	.00524		50	112	.00412		40	
7.50	.....	.00474		45	102	.00372		35	
8.00	.....	.00429			92	.00337			
8.50	.....	.00392	$\Delta g$			$\Delta g$	$\Delta g$		
9.00	.....	.00359	33	.00389	36	.00306	28	.00305	29
10.00	.....	.00302	57	.00353	59	.00278	47	.00276	48
12.50	.....	.00298	104	.00294	106	.00231	82	.00228	84
15.00	.....	.00131	67	.00188	67	.00149	52	.00144	52
17.50	.....	.00089	42	.00121	42	.00097	325	.00092	320
20.00	.....	.00062	27	.00079	26	.000645	207	.000600	200
22.50	.....	.00043	19	.00053	18	.000438	150	.000400	142
25.00	.....	.00030	13	.00035	11	.000288	92	.000258	84
27.50	.....	.00021	9	.00024	8	.000196	65	.000174	59
30.00	.....	.000150	58	.00016	46	.000131	41	.000115	37
35.00	.....	.000082	68	.000114	57	.000090	44	.000078	40
40.00	.....	.000045	37	.000057	27	.000046	21	.000038	18
45.00	.....	.000024	21	.000030	13	.000025	11	.000020	9
50.00	.....	.000012	12	.000017	7	.000014	6	.000011	4
				.000010		.000008		.000007	

TABLE 5-C—Continued  
Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=19$ )		$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=18$ )		$\Delta g$
		$m+g=180$	$m+g=130$			$m+g=180$	$m+g=130$	
.100	92	.0436		27	82	.0354		23
0.125	86	.0409		22	78	.0331		19
0.150	83	.0387		18	75	.0312		15
0.175	81	.0369		16	72	.0297		13
0.200	77	.0353		13	69	.0284		10
0.225	75	.0340		12	66	.0274		10
0.250	72	.0328		11	64	.0264		9
0.275	69	.0317		10	62	.0255		8
0.300	68	.0307		17	60	.0247		14
0.350	67	.0290		14	57	.0233		11
0.40	63	.0276		12	54	.0222		10
0.45	60	.0264		11	52	.0212		9
0.50	58	.0253		10	50	.0203		8
0.55	56	.0243		9	48	.0195		7
0.60	53	.0234		8	46	.0188		7
0.65	52	.0226		8	45	.0181		6
0.70	51	.0218		7	43	.0175		6
0.75	50	.0211		6	42	.0169		5
0.80	48	.0205		6	41	.0164		4
0.85	47	.0199		5	39	.0160		4
0.90	46	.0194		11	38	.0156		9
1.00	44	.0183		22	36	.0147		18
1.25	39	.0161		18	32	.0129		15
1.50	37	.0143		14	29	.0114		11
1.75	34	.0129		12	26	.0103		10
2.00	31	.0117		10	24	.0093		8
2.25	29	.0107		9	22	.0085		7
2.50	27	.0098		7	20	.0078		6
2.75	25	.0091		6	19	.0072		5
3.00	23	.0085		109	18	.0067		90
3.50	209	.00741		95	161	.00580		76
4.00	184	.00646		78	142	.00504		62
4.50	162	.00568		64	126	.00442		52
5.00	146	.00504		56	114	.00390		45
5.50	132	.00448		49	103	.00345		39
6.00	121	.00399		42	93	.00306		34
6.50	108	.00357		37	85	.00272		29
7.00	95	.00320		32	77	.00243		25
7.50	87	.00288		28	70	.00218		22
8.00	80	.00260			64	.00196		
8.50		$\Delta g$	$\Delta g$			$\Delta g$	$\Delta g$	
9.00		.00235 22	.00234 22			.00177 16	.00176 17	
10.00		.00213 38	.00212 39			.00161 31	.00159 31	
12.50		.00175 66	.00173 66			.00130 50	.00128 51	
15.00		.00109 40	.00107 40			.00080 30	.00077 30	
		.00069 245	.00067 243			.00050 177	.00047 173	
17.50		.000445 150	.000427 148			.000323 111	.000297 104	
20.00		.000295 107	.000279 105			.000212 79	.000193 74	
22.50		.000188 62	.000174 61			.000133 46	.000119 42	
25.00		.000126 40	.000113 39			.000087 30	.000077 27	
27.50		.000086 273	.000074 238			.000057 176	.000050 162	
30.00		.0000587 283	.0000512 255			.0000394 192	.0000338 174	
35.00		.0000304 145	.0000257 125			.0000202 97	.0000164 82	
40.00		.0000159 72	.0000132 60			.0000105 52	.0000082 41	
45.00		.0000087 35	.0000072 28			.0000053 25	.0000041 18	
50.00		.0000052	.0000044			.0000028	.0000023	



TABLE 5-C—Continued  
Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$		$Y_{220}$ ( $z=17$ )		$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=16$ )		$\Delta g$	
		$m+g=180$	$m+g=130$			$m+g=180$	$m+g=130$		
.100	76	.0278		19	66	.0212		14	
0.125	72	.0259		15	61	.0198		13	
0.125	68	.0244		12	59	.0185		10	
0.175	65	.0232		10	57	.0175		8	
0.200	62	.0222		8	55	.0167		7	
0.225	60	.0214		8	54	.0160		6	
0.250	58	.0206		7	52	.0154		5	
0.275	56	.0199		6	50	.0149		5	
0.300	54	.0193		11	49	.0144		8	
0.350	51	.0182		9	46	.0136		7	
0.40	49	.0173		8	44	.0129		6	
0.45	47	.0165		7	42	.0123		5	
0.50	45	.0158		6	40	.0118		5	
0.55	43	.0152		6	39	.0113		4	
0.60	42	.0146		5	37	.0109		38	
0.65	40	.0141		5	358	.01052		36	
0.70	39	.0136		4	344	.01016		32	
0.75	37	.0132		4	336	.00984		28	
0.80	36	.0128		4	324	.00956		25	
0.85	36	.0124		3	309	.00931		22	
0.90	35	.0121		7	301	.00909		50	
1.00	33	.0114		14	281	.00859		11	
1.25	29	.0100		12	252	.00748		90	
1.50	26	.0088		9	222	.00658		70	
1.75	24	.0079		80	202	.00588		60	
2.00	220	.00710		62	182	.00528		49	
2.25	202	.00648		54	169	.00479		42	
2.50	186	.00594		47	157	.00437		36	
2.75	173	.00547		41	146	.00401		32	
3.00	164	.00506		70	137	.00369		52	
3.50	144	.00436		58	119	.00317		43	
4.00	126	.00378		48	104	.00274		35	
4.50	112	.00330		40	91	.00239		29	
5.00	100	.00290		35	80	.00210		26	
5.50	90	.00255		30	71	.00184		22	
6.00	81	.00225		26	63	.00162		19	
6.50	73	.00199		22	56	.00143		16	
7.00	66	.00177		19	50	.00127		14	
7.50	60	.00158		17	45	.00113		13	
8.00	55	.00141		15	41	.00100		11	
8.50	.....	.00126		13	37	.00089		10	
9.00	.....	.00113		21	34	.00079		15	
10.00	.....	.00092		37	28	.00064		28	
12.50	.....	.00055		22	19	.00036		15	
15.00	.....	.00033			12	.00021			
17.50	.....	.000206	$\Delta g$			.000127	$\Delta g$		
20.00	.....	.000130	76	.000204	$\Delta g$	.000077	50	.000125	$\Delta g$
22.50	.....	.000081	49	.000127	77	.000077	31	.000074	51
25.00	.....	.000054	27	.000077	50	.000046	16	.000043	31
27.50	.....	.000036	18	.000050	27	.000030	10	.000027	16
		.000036	18	.000032	18	.000020	10	.000017	10
		115		105			64		57
30.00	.....	.0000245	127	.0000215	115	.0000136	71	.0000113	62
35.00	.....	.0000118	61	.0000100	52	.0000065	33	.0000051	26
40.00	.....	.0000057	29	.0000048	24	.0000032	16	.0000025	12
45.00	.....	.0000028	12	.0000024	10	.0000016	8	.0000013	6
50.00	.....	.0000016		.0000014		.0000008		.0000007	

TABLE 5-C—Continued  
Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$	$\Delta g$	$Y_{220}$ ( $z=15$ )		$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=14$ )		$\Delta g$	
		$m+g=180$	$m+g=130$			$m+g=180$	$m+g=130$		
.100	57	.0155		10	47	.0108		7	
0.125	53	.0145		9	44	.0101		6	
0.150	49	.0136		7	41	.0095		5	
0.175	46	.0129		6	39	.0090		4	
0.200	44	.0123		5	37	.0086		35	
0.225	42	.0118		5	355	.00825		30	
0.250	41	.0113		4	335	.00795		26	
0.275	40	.0109		3	321	.00769		23	
0.300	38	.0106		6	314	.00746		44	
0.350	36	.0100		50	298	.00702		38	
0.40	340	.00950		46	286	.00664		34	
0.45	326	.00904		42	274	.00630		30	
0.50	318	.00862		38	262	.00600		26	
0.55	306	.00824		34	250	.00574		24	
0.60	300	.00790		30	240	.00550		21	
0.65	292	.00760		27	231	.00529		19	
0.70	283	.00733		24	223	.00510		17	
0.75	275	.00709		21	216	.00493		15	
0.80	268	.00688		18	210	.00478		13	
0.85	261	.00670		14	205	.00465		11	
0.90	253	.00656		40	202	.00454		29	
1.00	243	.00616		80	191	.00425		57	
1.25	212	.00536		62	168	.00368		44	
1.50	184	.00474		50	150	.00324		36	
1.75	164	.00424		42	136	.00288		30	
2.00	146	.00382		37	124	.00258		26	
2.25	134	.00345		32	113	.00232		22	
2.50	124	.00313		28	103	.00210		19	
2.75	116	.00285		25	94	.00191		17	
3.00	109	.00260		38	86	.00174		27	
3.50	95	.00222		31	75	.00147		22	
4.00	83	.00191		25	66	.00125		18	
4.50	73	.00166		21	59	.00107		15	
5.00	65	.00145		18	53	.00092		12	
5.50	57	.00127		15	47	.00080		100	
6.00	50	.00112		13	420	.000700		86	
6.50	44	.00099		12	376	.000614		73	
7.00	40	.00087		10	329	.000541		64	
7.50	36	.00077		9	293	.000477		57	
8.00	32	.00068		78	260	.000420		50	
8.50	288	.000602		69	232	.000370		44	
9.00	257	.000533		108	207	.000326		71	
10.00	215	.000425		190	170	.000255		118	
12.50	125	.000235		98	98	.000137		62	
15.00	73	.000137			62	.000075			
17.50		.0000765				$\Delta g$	$\Delta g$		
20.00		.0000459	306	.0000760	310	.0000407	170	.0000404	172
22.50		.0000270	189	.0000450	192	.0000237	97	.0000232	98
25.00		.0000173	97	.0000258	98	.0000140	55	.0000062	55
27.50		.0000110	63	.0000160	63	.0000085	32	.0000079	32
30.00			36	.0000097	34	.0000053		.0000047	
35.00		.0000074					187		175
40.00		.0000034	40	.0000063	36	.00000343	193	.00000295	173
45.00		.0000017	17	.0000027	14	.00000150	79	.00000122	64
50.00		.0000008	9	.0000013	7	.00000071	38	.00000058	30
		.0000004	4	.0000006	3	.00000033		.00000028	
				.0000003		.00000016	17	.00000014	14

TABLE 5-C—Continued  
 Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=13$ )		$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=12$ )		$\Delta g$
		$m+g=180$	$m+g=130$			$m+g=180$	$m+g=130$	
.100	350	.00730		48	268	.00462		32
0.125	328	.00682		40	252	.00430		26
0.150	308	.00642		34	238	.00404		22
0.175	292	.00608		28	226	.00382		18
0.200	280	.00580			216	.00364		
				24				16
0.225	269	.00556		21	208	.00348		14
0.250	260	.00535		19	201	.00334		12
0.275	253	.00516		17	194	.00322		11
0.300	247	.00499		29	188	.00311		19
0.350	232	.00470		26	178	.00292		
				23	168	.00276		16
0.40	220	.00444		21	159	.00262		14
0.45	209	.00421		18	151	.00249		13
0.50	200	.00400		16	144	.00238		11
0.55	192	.00382		15	138	.00228		10
0.60	184	.00366		14	133	.00218		10
				12	128	.00209		9
0.65	178	.00351		10	124	.00201		8
0.70	173	.00337		9	121	.00194		7
0.75	168	.00325		8	118	.00188		6
0.80	163	.00315						5
0.85	159	.00306		20	115	.00183		
				17	107	.00171		12
0.90	156	.00298		38	92	.00148		23
1.00	147	.00278		29	82	.00129		19
1.25	128	.00240		24	74	.00113		16
1.50	113	.00211		20				
1.75	101	.00187						130
				17	670	.001000		
2.00	81	.00167		15	610	.000890		110
2.25	82	.00150		13	555	.000795		95
2.50	75	.00135		11	507	.000713		82
2.75	69	.00122			469	.000641		72
3.00	63	.00111		18				
				14	404	.000526		115
3.50	54	.00093		12	354	.000436		90
4.00	46	.00079		10	304	.000366		70
4.50	40	.00067		8	259	.000311		55
5.00	35	.00057			224	.000266		45
5.50	31	.00049		65				
				56	196	.000229		37
6.00	275	.000425		47	171	.000198		31
6.50	245	.000369		41	150	.000172		26
7.00	219	.000322		35	131	.000150		22
7.50	186	.000281		30	115	.000131		19
8.00	174	.000246						
				27	102	.000114		17
8.50	154	.000216		44	90	.000099		15
9.00	137	.000189		69	71	.000074		25
10.00	110	.000145		36	39	.000037		37
12.50	61	.000076			21	.000019		18
15.00	35	.000040						
		$\Delta g$	$\Delta g$					96
17.50		.0000204	.0000202	91		.0000094		
20.00		.0000113	.0000110	92		.0000050		44
22.50		.0000065	.0000062	48		.0000028		22
25.00		.0000039	.0000036	26		.0000016		12
27.50		.0000025	.0000022	14		.0000009		7
				90				
				84		$\Delta g$	$\Delta g$	
30.00		.00000160	.00000136	79		.00000056	.00000055	33
35.00		.00000071	.00000057	39		.00000023	.00000022	13
40.00		.00000032	.00000026	18		.00000009	.00000009	4
45.00		.00000014	.00000012	7		.00000005	.00000005	3
50.00		.00000007	.00000006			.00000002	.00000002	

TABLE 5-C—Continued  
Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=11$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=10$ )	$\Delta g$
.100	202	.00260		124	.00136	
0.125	189	.00241	19	114	.00127	9
0.150	179	.00225	16	106	.00119	8
0.175	169	.00213	12	101	.00112	7
0.200	162	.00202	11	96	.00106	6
			9			50
0.225	154	.00193	8	920	.001010	
0.250	149	.00185	7	884	.000966	44
0.275	144	.00178	7	852	.000928	38
0.300	140	.00171	7	815	.000895	33
0.350	132	.00160	11	762	.000838	57
			9			51
0.40	125	.00151	8	723	.000787	
0.45	119	.00143	7	688	.000742	45
0.50	113	.00136	6	658	.000702	40
0.55	108	.00130	6	633	.000667	35
0.60	104	.00124	5	604	.000636	31
			5			28
0.65	99	.00119	5	582	.000608	
0.70	95	.00114	4	557	.000583	25
0.75	91	.00110	4	539	.000561	22
0.80	88	.00106	3	518	.000542	19
0.85	85	.00103	3	504	.000526	16
			3			14
0.90	83	.00100	6	488	.000512	
1.00	77	.00094	13	463	.000477	35
1.25	67	.00081	11	409	.000401	76
1.50	59	.00070	9	356	.000344	57
1.75	52	.00061	76	313	.000297	47
			63			40
2.00	466	.000534	52	277	.000257	
2.25	419	.000471	43	246	.000225	32
2.50	376	.000419	36	219	.000200	25
2.75	337	.000376	62	194	.000182	18
3.00	301	.000340	48	172	.000168	14
			37			32
3.50	248	.000278	31	142	.000136	
4.00	206	.000230	25	119	.000111	25
4.50	173	.000193	21	101	.000092	19
5.00	149	.000162	17	86	.000076	16
5.50	129	.000137	14	74	.000063	13
			12			97
6.00	113	.000116	11	627	.0000533	
6.50	99	.000099	90	541	.0000449	84
7.00	87	.000085	75	472	.0000378	71
7.50	77	.000073	120	411	.0000319	59
8.00	69	.000062	175	350	.0000270	49
			82			40
8.50	610	.0000530	396	300	.0000230	
9.00	535	.0000455	184	259	.0000196	34
10.00	405	.0000335	95	193	.0000142	54
12.50	210	.0000160	46	94	.0000066	76
15.00	112	.0000078	25	48	.0000030	36
			136			160
17.50	556	.00000384	124	244	.00000140	
20.00	300	.00000200	46	130	.00000070	70
22.50	175	.00000105	19	70	.00000035	35
25.00	101	.00000059	8	40	.00000019	16
27.50	56	.00000034		24	.00000010	9
						41
30.00	.....	.000000204	124	145	.000000059	
35.00	.....	.000000080	46	60	.000000020	39
40.00	.....	.000000034	19	27	.000000007	13
45.00	.....	.000000015	8	12	.000000003	4
50.00	.....	.000000007		6	.000000001	2



TABLE 5-C—Continued  
Values of  $Y_{220}$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$

$g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=9$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$Y_{220}$ ( $z=8$ )	$\Delta g$
.100	753	.000607		374	.000223	
0.125	711	.000559	48	341	.000208	15
0.150	670	.000520	39	325	.000195	13
0.175	632	.000488	32	304	.000184	11
0.200	598	.000462	26	287	.000175	9
			23			8
0.225	571	.000439		272	.000167	
0.250	547	.000419	20	259	.000160	7
0.275	526	.000402	17	248	.000154	6
0.300	507	.000388	14	239	.000149	5
0.350	472	.000363	25	224	.000139	10
			22			9
0.40	446	.000341		211	.000130	
0.45	420	.000322	19	200	.000122	8
0.50	397	.000305	17	190	.000115	7
0.55	377	.000290	15	181	.000109	6
0.60	359	.000277	13	173	.000104	5
			12			46
0.65	343	.000265	11	1656	.0000994	
0.70	329	.000254	11	1586	.0000954	40
0.75	317	.000244	10	1521	.0000919	35
0.80	307	.000235	9	1462	.0000888	31
0.85	300	.000226	9	1400	.0000860	28
			8			25
0.90	294	.000218		1345	.0000835	
1.00	272	.000205	13	1275	.0000775	60
1.25	226	.000175	30	1097	.0000653	122
1.50	193	.000151	24	954	.0000556	97
1.75	166	.000131	20	835	.0000475	81
			167			68
2.00	1427	.0001143		736	.0000407	
2.25	1246	.0001004	139	653	.0000351	56
2.50	1112	.0000888	116	584	.0000304	47
2.75	1032	.0000788	100	524	.0000264	41
3.00	980	.0000700	88	470	.0000230	34
			155			53
3.50	815	.0000545		368	.0000177	
4.00	680	.0000430	115	293	.0000137	40
4.50	575	.0000345	85	236	.0000109	28
5.00	479	.0000281	64	193	.0000088	21
5.50	399	.0000231	50	159	.0000072	16
			40			13
6.00	342	.0000191		132	.0000059	
6.50	291	.0000158	33	110	.0000048	11
7.00	247	.0000131	27	92	.0000039	9
7.50	210	.0000109	22	77	.0000032	7
8.00	179	.0000091	18	65	.0000026	6
			145			50
8.50	1535	.00000765		555	.00000210	
9.00	1323	.00000637	128	465	.00000172	38
10.00	970	.00000450	187	335	.00000115	57
12.50	470	.00000190	260	149	.00000041	74
15.00	223	.00000077	113	62	.00000015	26
			440			91
17.50	1070	.000000330		274	.000000056	
20.00	547	.000000153	177	130	.000000023	33
22.50	278	.000000072	81	62	.000000010	13
25.00	155	.000000035	37	31	.000000004	6
27.50	82	.000000018	17	16	.000000002	2
			850			94
30.00	4950	.00000000950		864	.00000000086	
35.00	1730	.00000000270	680	250	.00000000020	66
40.00	624	.00000000076	194	71	.00000000005	15
45.00	278	.00000000022	54	18	.00000000004	1
50.00	93	.00000000007	15			







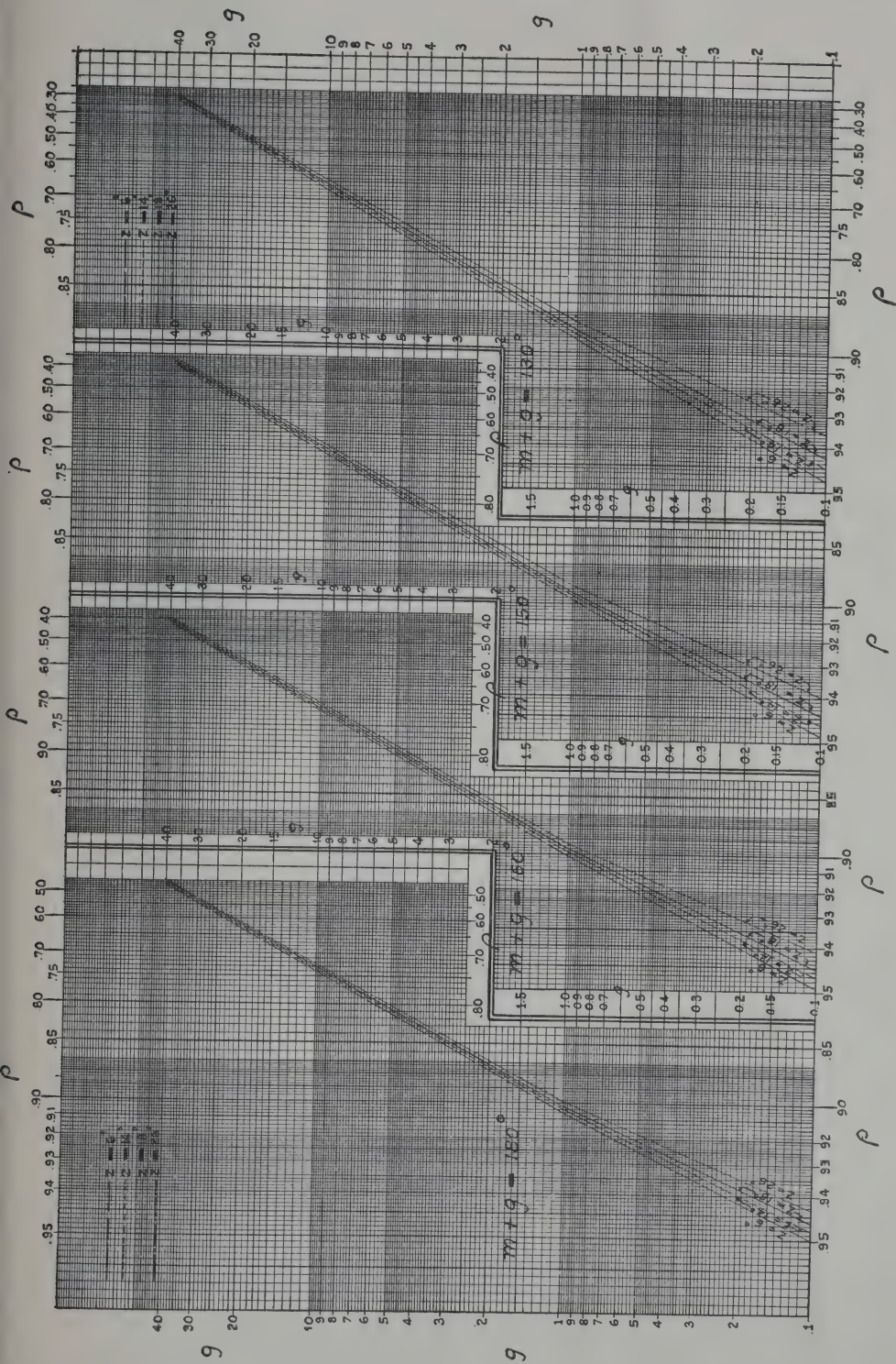


CHART 6



## NOTE ON TABLE 6-C

Each column headed " $\rho$ " represents a curve on Chart 6. Each gives, for one value of  $z$ , the value of  $\rho$  corresponding to each of the values of  $g$  given in the first column. The intervening columns, headed  $\Delta g$  and  $\Delta z$  respectively, give values of decrements and increments. Each of the former gives the vertical decrements for the " $\rho$ " column adjacent to which it is placed. The latter give the horizontal increments of  $\rho$  for given values of  $g$ . Significant figures only are given in these columns since decimals are disregarded.

For example, in part I, the value "3" which heads the first " $\Delta g$ " column is the difference between the first two values in the column,  $\rho$  ( $z=26$ ), viz., .944 and .941. The value "3" which heads the first " $\Delta z$ " column is the difference between the first values in the two " $\rho$ " columns " $z=26$ " and " $z=18$ ", respectively, viz., .944 and .947.

TABLE 6-C  
PART I  
Values of  $\rho$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$ .  
 $m+g=180^\circ$

$g$	$\rho$ ( $z=26$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=18$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=14$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=6$ )	$\Delta g$
.100	.944	3	3	.947	3	1	.948	2	2	.950	2
0.125	.941	2	3	.944	2	2	.946	2	2	.948	3
0.150	.939	3	3	.942	2	2	.944	2	1	.945	1
0.175	.936	2	4	.940	2	2	.942	2	2	.944	2
0.200	.934	1	4	.938	2	2	.940	2	2	.942	2
0.225	.933	2	3	.936	2	2	.938	2	2	.940	2
0.250	.931	2	3	.934	1	2	.936	2	2	.938	1
0.275	.929	1	4	.933	2	1	.934	1	3	.937	2
0.300	.928	3	3	.931	3	2	.933	3	2	.935	2
0.350	.925	3	3	.928	3	2	.930	3	3	.933	3
0.40	.922	3	3	.925	2	2	.927	2	3	.930	3
0.45	.919	2	4	.923	3	2	.925	2	2	.927	2
0.50	.917	3	3	.920	2	3	.923	3	2	.925	2
0.55	.914	2	4	.918	2	2	.920	2	3	.923	2
0.60	.912	2	4	.916	2	2	.918	2	3	.921	2
0.65	.910	2	4	.914	2	2	.916	2	3	.919	2
0.70	.908	1	4	.912	2	2	.914	1	3	.917	2
0.75	.907	2	3	.910	2	3	.913	2	2	.915	2
0.80	.905	2	3	.908	1	3	.911	2	2	.913	1
0.85	.903	1	4	.907	2	2	.909	1	3	.912	2
0.90	.902	3	3	.905	3	3	.908	3	2	.910	3
1.00	.899	9	3	.902	9	3	.905	9	2	.907	8
1.25	.890	8	3	.893	8	3	.896	8	3	.899	8
1.50	.882	8	3	.885	7	3	.888	7	3	.891	8
1.75	.874	7	4	.878	7	3	.881	7	2	.883	7
2.00	.867	6	4	.871	7	3	.874	7	2	.876	6
2.25	.861	7	3	.864	6	3	.867	6	3	.870	6
2.50	.854	6	4	.858	6	3	.861	6	3	.864	6
2.75	.848	6	4	.852	6	3	.855	6	3	.858	6
3.00	.842	11	4	.846	11	3	.849	10	3	.852	10
3.50	.831	10	4	.835	10	4	.839	10	3	.842	10
4.00	.821	10	4	.825	10	4	.829	10	3	.832	10
4.50	.811	10	4	.815	9	4	.819	9	4	.823	10
5.00	.801	10	5	.806	9	4	.810	10	3	.813	8
5.50	.791	9	6	.797	8	3	.800	8	5	.805	9
6.00	.782	8	7	.789	8	3	.792	8	4	.796	8
6.50	.774	8	7	.781	8	3	.784	8	4	.788	8
7.00	.766	7	7	.773	8	3	.776	8	4	.780	8
7.50	.759	7	6	.765	7	3	.768	7	4	.772	7
8.00	.752	7	6	.758	7	3	.761	6	4	.765	7
8.50	.745	7	6	.751	7	3	.754	7	4	.758	7
9.00	.738	15	6	.744	14	6	.747	14	5	.752	13
10.00	.723	33	7	.730	32	3	.733	32	6	.739	33
12.50	.690	30	8	.698	30	4	.701	29	5	.706	29
15.00	.660	28	8	.668	28	5	.672	27	6	.677	26
17.50	.632	26	8	.640	26	6	.645	25	6	.651	25
20.00	.606	24	8	.614	24	6	.620	24	6	.626	23
22.50	.582	22	8	.590	22	6	.596	22	7	.603	23
25.00	.560	20	8	.568	20	6	.574	20	6	.580	21
27.50	.540	20	8	.548	20	6	.554	20	5	.559	19
30.00	.520	40	8	.528	40	6	.534	40	6	.540	40
35.00	.480	37	8	.488	37	6	.494	37	6	.500	35
40.00	.443	35	8	.451	35	6	.457	34	8	.465	33
45.00	.408	34	8	.416	33	7	.423	33	9	.432	32
50.00	.374		9	.383		7	.390		10	.400	

TABLE 6-C  
PART II  
Values of  $\rho$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$ .  
 $m+g=160^\circ$

$g$	$\rho$ ( $z=26$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=18$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=14$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=6$ )	$\Delta g$
.100	.941	3	4	.945	3	2	.947	2	2	.949	
0.125	.938	3	4	.942	2	3	.945	3	2	.947	2
0.150	.935	2	5	.940	3	2	.942	2	3	.945	2
0.175	.933	2	4	.937	3	3	.940	2	2	.942	3
0.200	.931	2	4	.935	2	3	.938	2	2	.940	2
		2			2			2			1
0.225	.929	2	4	.933	2	3	.936	2	3	.939	
0.250	.927	2	4	.931	2	3	.934	2	3	.937	2
0.275	.925	1	4	.929	1	3	.932	1	3	.935	2
0.300	.924	3	4	.928	3	3	.931	4	2	.933	2
0.350	.921	3	4	.925	3	2	.927	3	3	.930	3
		3			3			3			3
0.40	.918	3	4	.922	3	2	.924	3	3	.927	3
0.45	.915	2	4	.919	2	2	.921	3	3	.924	3
0.50	.913	3	4	.917	2	1	.918	2	4	.922	2
0.55	.910	2	5	.915	3	1	.916	3	3	.919	3
0.60	.908	2	4	.912	2	1	.913	2	3	.916	2
		2			2			2			2
0.65	.906	3	4	.910	2	1	.911	2	3	.914	2
0.70	.903	2	5	.908	2	1	.909	2	3	.912	2
0.75	.901	2	5	.906	3	1	.907	1	3	.910	2
0.80	.899	1	4	.903	2	3	.906	2	2	.908	2
0.85	.898	2	3	.901	1	3	.904	2	2	.906	1
		3			4			4			4
0.90	.896	10	3	.900	9	2	.902	9	3	.905	9
1.00	.893	9	4	.896	9	2	.898	9	3	.901	8
1.25	.883	9	4	.887	8	2	.889	8	4	.892	8
1.50	.874	8	5	.878	8	2	.880	8	4	.884	8
1.75	.865	8		.870	8		.872	8		.876	8
		8			8			8			8
2.00	.857	8	5	.862	7	2	.864	7	4	.868	7
2.25	.849	7	6	.855	7	2	.857	7	4	.861	7
2.50	.842	7	6	.848	7	2	.850	7	4	.854	6
2.75	.835	6	6	.841	6	3	.844	6	4	.848	6
3.00	.829	12	6	.835	12	3	.838	12	4	.842	12
		12			12			12			12
3.50	.817	12	6	.823	11	4	.826	11	4	.830	11
4.00	.805	11	6	.811	11	4	.815	11	4	.819	10
4.50	.794	10	6	.800	10	4	.804	10	5	.809	10
5.00	.784	10	6	.790	10	4	.794	10	5	.799	10
5.50	.774	10	6	.780	10	4	.784	10	5	.789	10
		10			10			10			10
6.00	.764	9	6	.770	9	4	.774	9	5	.779	9
6.50	.755	9	6	.761	8	4	.765	9	5	.770	8
7.00	.746	8	7	.753	8	3	.756	8	6	.762	8
7.50	.738	8	7	.745	8	3	.748	8	6	.754	8
8.00	.730	8	7	.737	8	3	.740	8	6	.746	8
		8			8			8			8
8.50	.722	8	7	.729	8	3	.732	7	6	.738	7
9.00	.714	14	7	.721	14	4	.725	14	6	.731	14
10.00	.700	38	7	.707	37	4	.711	36	6	.717	35
12.50	.662	32	8	.670	32	5	.675	32	7	.682	31
15.00	.630	32	8	.638	32	5	.643	31	8	.651	30
		32			32			31			30
17.50	.591	29	8	.606	29	6	.612	28	9	.621	28
20.00	.569	26	8	.577	26	7	.584	26	9	.593	26
22.50	.543	25	8	.551	25	7	.558	25	9	.567	25
25.00	.518	24	8	.526	24	7	.533	24	9	.542	24
27.50	.494	20	8	.502	20	7	.509	20	9	.518	20
		20			20			20			20
30.00	.474	45	8	.482	44	7	.489	44	9	.498	44
35.00	.429	39	9	.438	38	7	.445	38	9	.454	38
40.00	.390	38	10	.400	37	7	.407	37	9	.416	36
45.00	.352	36	11	.363	36	7	.370	35	10	.380	34
50.00	.316	11	11	.327	8		.335	11		.346	

TABLE 6-C  
PART III  
Values of  $\rho$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$ .  
 $m+g=150^\circ$

$g$	$\rho$ ( $z=26$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=18$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=14$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=6$ )	$\Delta g$
.100	.940	3	5	.945	3	2	.947	3	2	.949	3
.125	.937	3	5	.942	3	2	.944	3	2	.946	3
.150	.934	3	5	.939	3	2	.941	2	2	.943	2
.175	.931	2	5	.936	3	3	.939	3	2	.941	2
.200	.929	2	5	.934	2	2	.936	3	3	.939	2
		2			2			2			2
.225	.927	2	5	.932	2	2	.934	2	3	.937	2
.250	.925	2	5	.930	2	2	.932	1	3	.935	1
.275	.923	2	5	.928	1	3	.931	2	3	.934	2
.300	.921	3	6	.927	2	2	.929	3	3	.932	3
.350	.918	3	5	.923	4	3	.926	3	3	.929	3
		3			3			3			3
.40	.915	3	5	.920	3	3	.923	3	3	.926	3
.45	.912	3	5	.917	3	3	.920	3	3	.923	3
.50	.909	3	5	.914	3	3	.917	3	3	.920	2
.55	.906	3	5	.911	3	3	.914	3	4	.918	3
.60	.904	2	5	.909	2	3	.912	2	3	.915	2
		3			3			3			2
.65	.901	2	5	.906	2	3	.909	2	4	.913	3
.70	.899	3	5	.904	1	3	.907	2	3	.910	2
.75	.896	2	7	.903	2	2	.905	2	3	.908	2
.80	.894	2	7	.901	3	2	.903	2	3	.906	2
.85	.892	2	6	.898	2	3	.901	2	3	.904	2
		2			2			2			2
.90	.890	4	6	.896	4	3	.899	4	3	.902	4
1.00	.886	10	6	.892	10	3	.895	10	3	.898	10
1.25	.876	10	6	.882	9	3	.885	9	3	.888	9
1.50	.866	9	7	.873	9	3	.876	9	3	.879	9
1.75	.857	9	7	.864	9	3	.867	9	3	.870	8
		8			8			9			7
2.00	.849	8	7	.856	8	2	.858	7	4	.862	7
2.25	.841	7	7	.848	7	3	.851	7	4	.855	7
2.50	.834	7	7	.841	7	3	.844	7	4	.848	7
2.75	.827	7	7	.834	6	3	.837	6	4	.841	6
3.00	.820	7	8	.828	6	3	.831	6	4	.835	6
		14			14			13			13
3.50	.806	12	8	.814	12	4	.818	12	4	.822	10
4.00	.794	12	8	.802	11	4	.806	11	4	.810	11
4.50	.782	11	9	.791	11	4	.795	11	4	.799	10
5.00	.771	10	9	.780	10	4	.784	10	5	.789	10
5.55	.761	10	9	.770	10	4	.774	10	5	.779	10
		10			10			10			10
6.00	.751	10	9	.760	10	4	.764	10	5	.769	10
6.50	.741	9	9	.750	9	4	.754	9	5	.759	9
7.00	.732	9	9	.741	9	4	.745	9	5	.750	9
7.50	.723	9	9	.732	8	4	.736	9	5	.741	8
8.00	.714	8	9	.723	7	4	.727	8	6	.733	8
		7			7			7			7
8.50	.706	19	9	.715	18	4	.719	16	6	.725	14
9.00	.699	38	10	.708	38	6	.712	37	7	.718	36
10.00	.680	35	10	.690	35	7	.696	35	8	.703	34
12.50	.642	32	10	.652	32	7	.659	32	9	.667	31
15.00	.607	30	10	.617	30	7	.624	30	10	.633	29
		28			28			28			27
17.50	.575	26	10	.585	26	7	.592	26	12	.602	25
20.00	.545	25	10	.555	24	7	.562	24	13	.573	24
22.50	.517	24	11	.527	24	7	.534	24	13	.546	24
25.00	.491	24	11	.501	24	7	.508	24	13	.521	24
27.50	.466	24	11	.477	24	7	.484	24	13	.497	24
		48			47			46			45
30.00	.442	43	12	.453	43	8	.460	42	14	.473	42
35.00	.394	41	12	.406	40	9	.414	40	15	.428	39
40.00	.351	38	13	.363	38	9	.372	37	16	.386	36
45.00	.310	38	13	.323	38	10	.332	37	16	.347	36
50.00	.272	38	13	.285	38	10	.295	37	16	.311	36



TABLE 6-C  
PART IV  
Values of  $\rho$  for Different Values of  $g$ , of  $z$ , and of  $m+g$   
 $m+g=130^\circ$

$g$	$\rho$ ( $z=26$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=18$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=14$ )	$\Delta g$	$\Delta z$	$\rho$ ( $z=6$ )	$\Delta g$
.100	.936	3	7	.943	3	2	.945	3	3	.948	3
.125	.933	3	7	.940	3	2	.942	3	3	.945	3
.150	.930	3	7	.937	3	2	.939	2	3	.942	2
.175	.927	2	7	.934	3	3	.937	2	3	.940	2
.200	.925	3	6	.931	2	4	.935	3	3	.938	3
.225	.922	2	7	.929	2	3	.932	2	3	.935	2
.250	.920	2	7	.927	2	3	.930	2	3	.933	2
.275	.918	2	7	.925	2	3	.928	2	3	.931	2
.300	.916	4	7	.923	4	3	.926	4	3	.929	3
.350	.912	3	7	.919	3	3	.922	3	4	.926	3
.40	.909	4	7	.916	4	3	.919	3	4	.923	3
.45	.905	3	7	.912	2	4	.916	3	4	.920	3
.50	.902	3	8	.910	3	3	.913	3	4	.917	3
.55	.899	2	8	.907	3	3	.910	3	4	.914	3
.60	.897	3	7	.904	3	3	.907	3	4	.911	3
.65	.894	3	7	.901	2	3	.904	2	4	.908	2
.70	.891	2	8	.899	3	3	.902	3	4	.906	3
.75	.889	3	7	.896	2	3	.899	2	4	.903	2
.80	.886	2	8	.894	3	3	.897	2	4	.901	3
.85	.884	2	7	.891	2	4	.895	3	3	.898	2
.90	.882	4	7	.889	4	3	.892	4	4	.896	4
1.00	.878	13	7	.885	12	3	.888	11	4	.892	11
1.25	.865	10	8	.873	10	4	.877	11	4	.881	10
1.50	.855	11	7	.862	9	4	.866	10	5	.871	9
1.75	.844	10	9	.853	10	3	.856	9	6	.862	9
2.00	.834	9	9	.843	9	4	.847	9	6	.853	8
2.25	.825	8	9	.834	8	4	.838	8	7	.845	8
2.50	.817	7	9	.826	7	4	.830	7	7	.837	7
2.75	.810	7	9	.819	7	4	.823	7	7	.830	7
3.00	.803	14	9	.812	14	4	.816	14	7	.823	13
3.50	.789	14	9	.798	13	4	.802	13	8	.810	13
4.00	.775	13	10	.785	13	4	.789	13	8	.797	13
4.50	.762	12	10	.772	12	4	.776	12	8	.784	12
5.00	.750	11	10	.760	11	4	.764	11	8	.772	11
5.55	.739	11	10	.749	11	4	.753	11	8	.761	11
6.00	.728	11	10	.738	11	4	.742	11	8	.750	10
6.50	.717	11	10	.727	11	4	.731	11	9	.740	10
7.00	.706	11	10	.716	11	4	.720	10	10	.730	10
7.50	.695	10	10	.705	10	5	.710	10	10	.720	9
8.00	.685	9	10	.695	9	5	.700	9	11	.711	9
8.50	.676	8	10	.686	8	5	.691	8	11	.702	8
9.00	.668	18	10	.678	18	5	.683	17	11	.694	17
10.00	.650	41	10	.660	40	6	.666	40	11	.677	40
12.50	.609	39	11	.620	38	6	.626	38	11	.637	37
15.00	.570	37	12	.582	36	6	.588	36	12	.600	35
17.50	.533	34	13	.546	34	6	.552	34	13	.565	33
20.00	.599	32	13	.512	31	6	.518	32	14	.532	31
22.50	.467	29	14	.481	29	5	.486	28	15	.501	29
25.00	.438	27	14	.452	27	6	.458	27	14	.472	27
27.50	.411	26	14	.425	26	6	.431	26	14	.445	25
30.00	.385	50	14	.399	50	6	.405	50	15	.420	49
35.00	.335	45	14	.349	45	6	.355	45	16	.371	44
40.00	.290	42	14	.304	42	6	.310	41	17	.327	41
45.00	.248	39	14	.262	38	7	.269	38	17	.286	37
50.00	.209		15	.224		7	.231		18	.249	

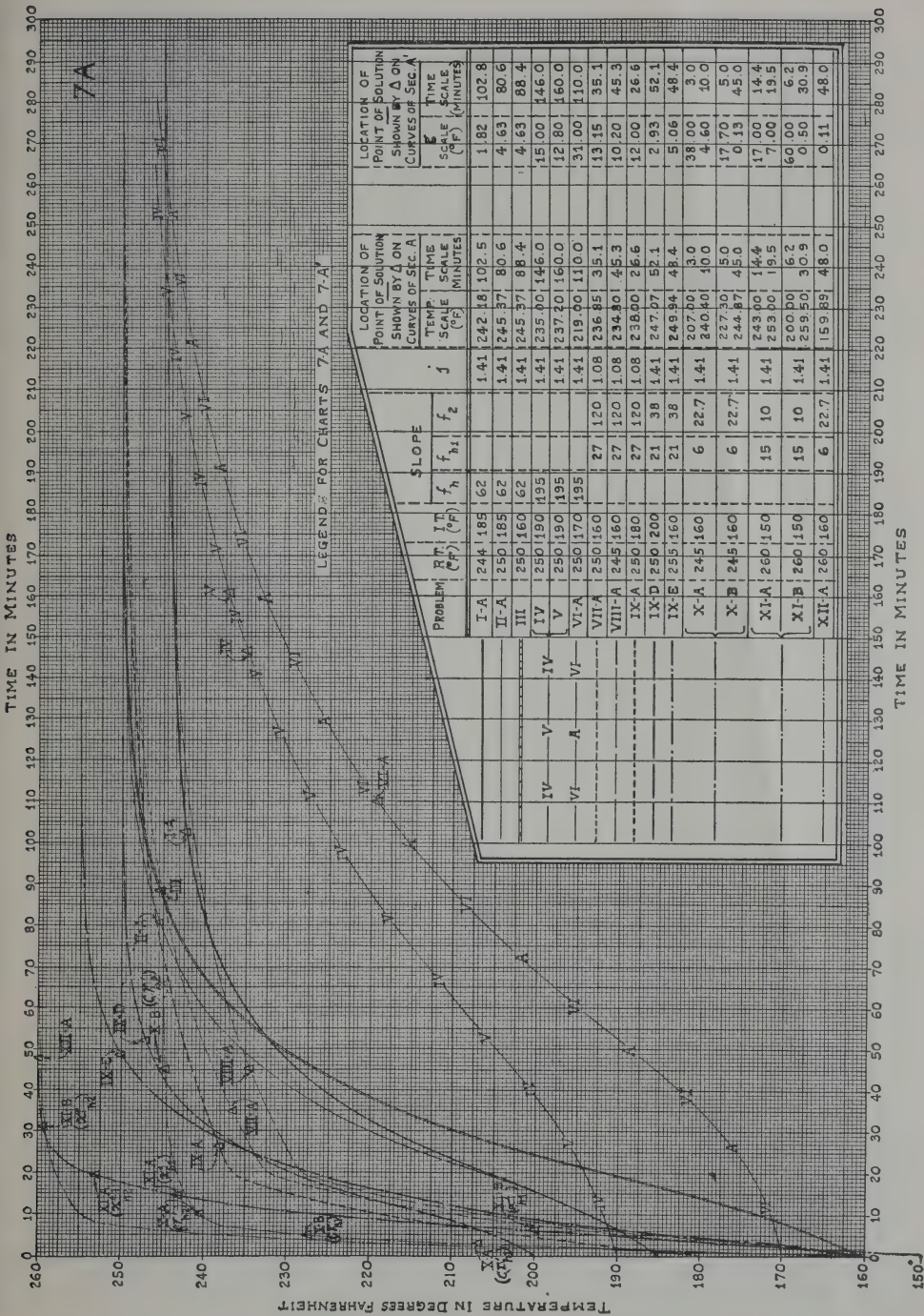
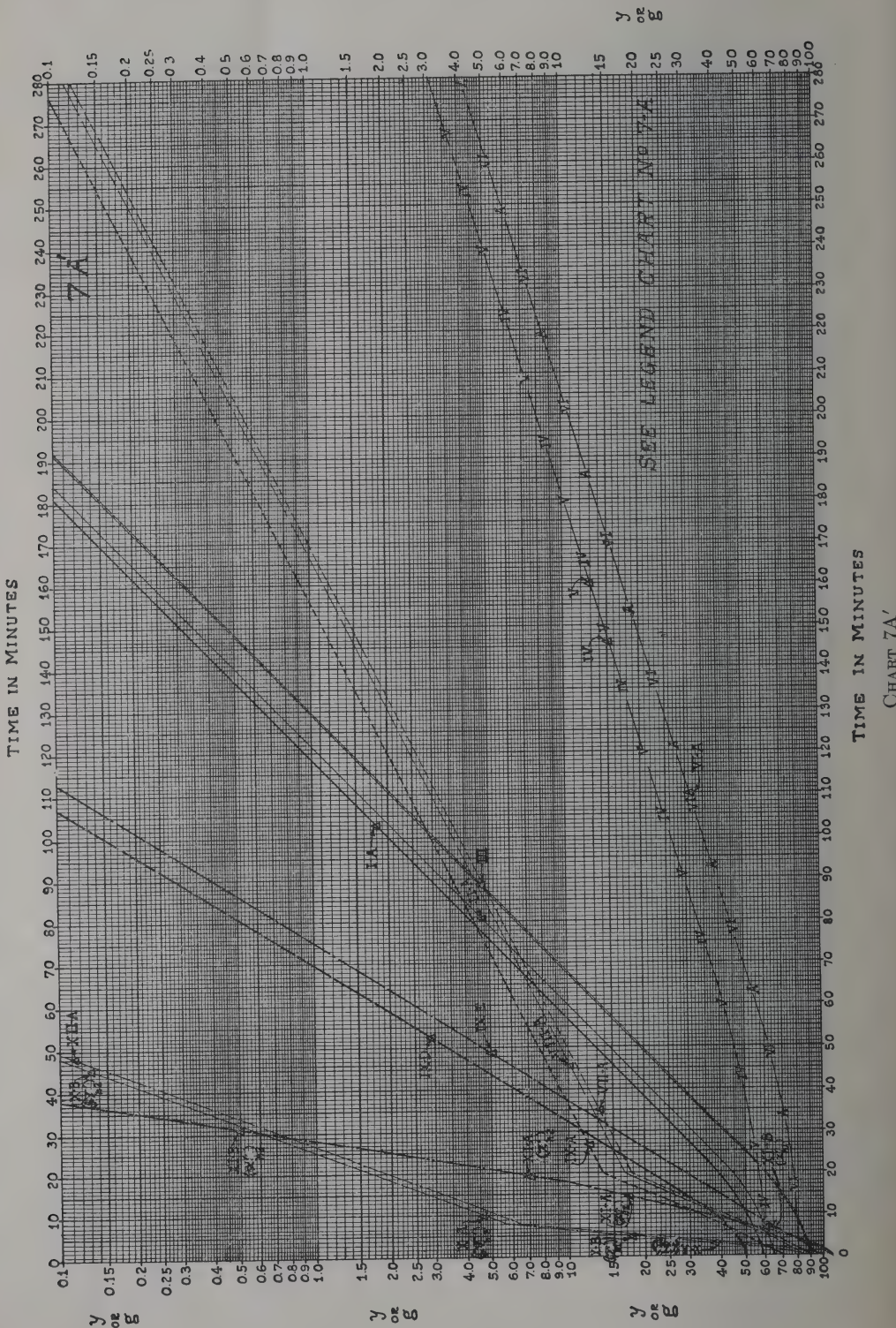


CHART 7A







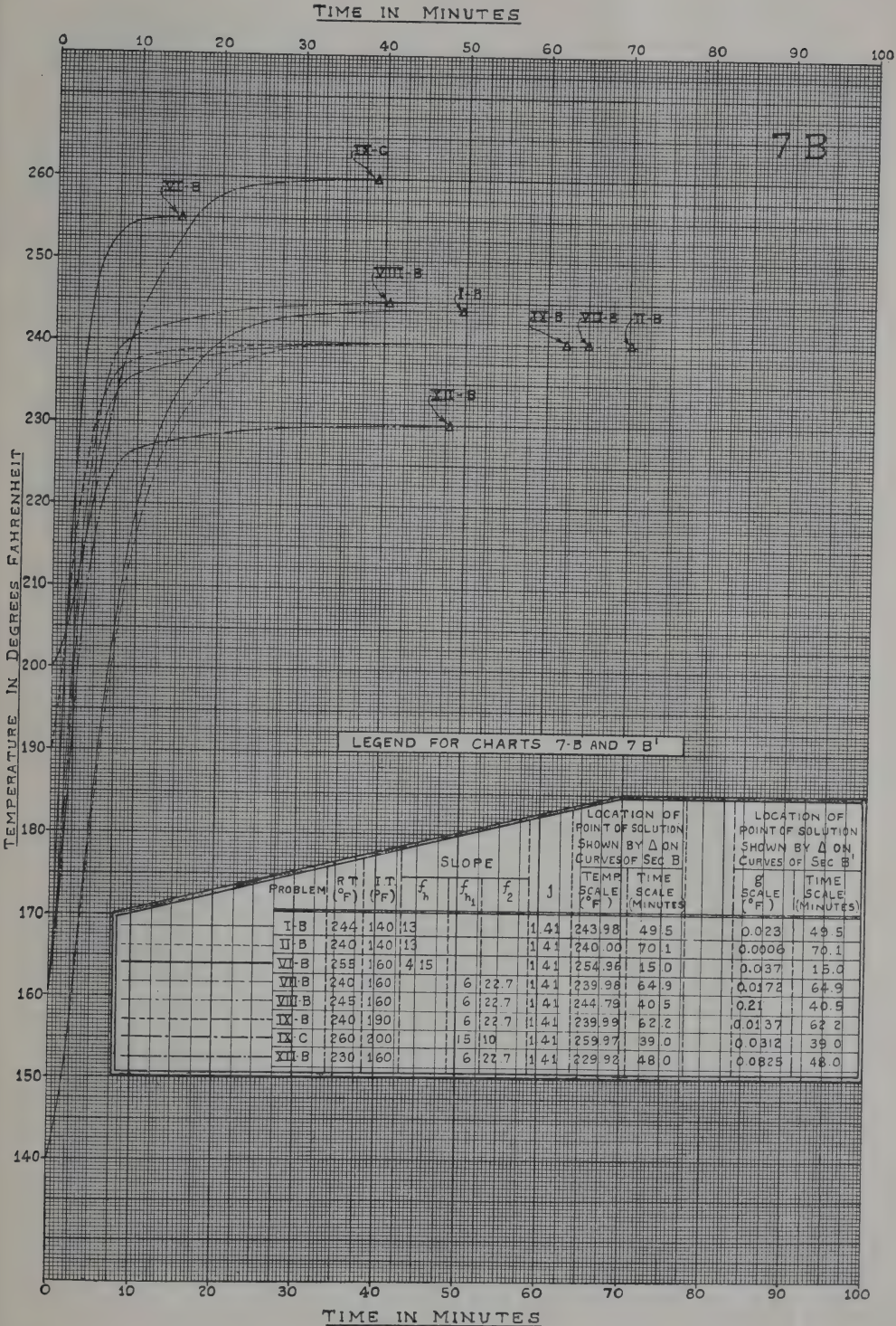
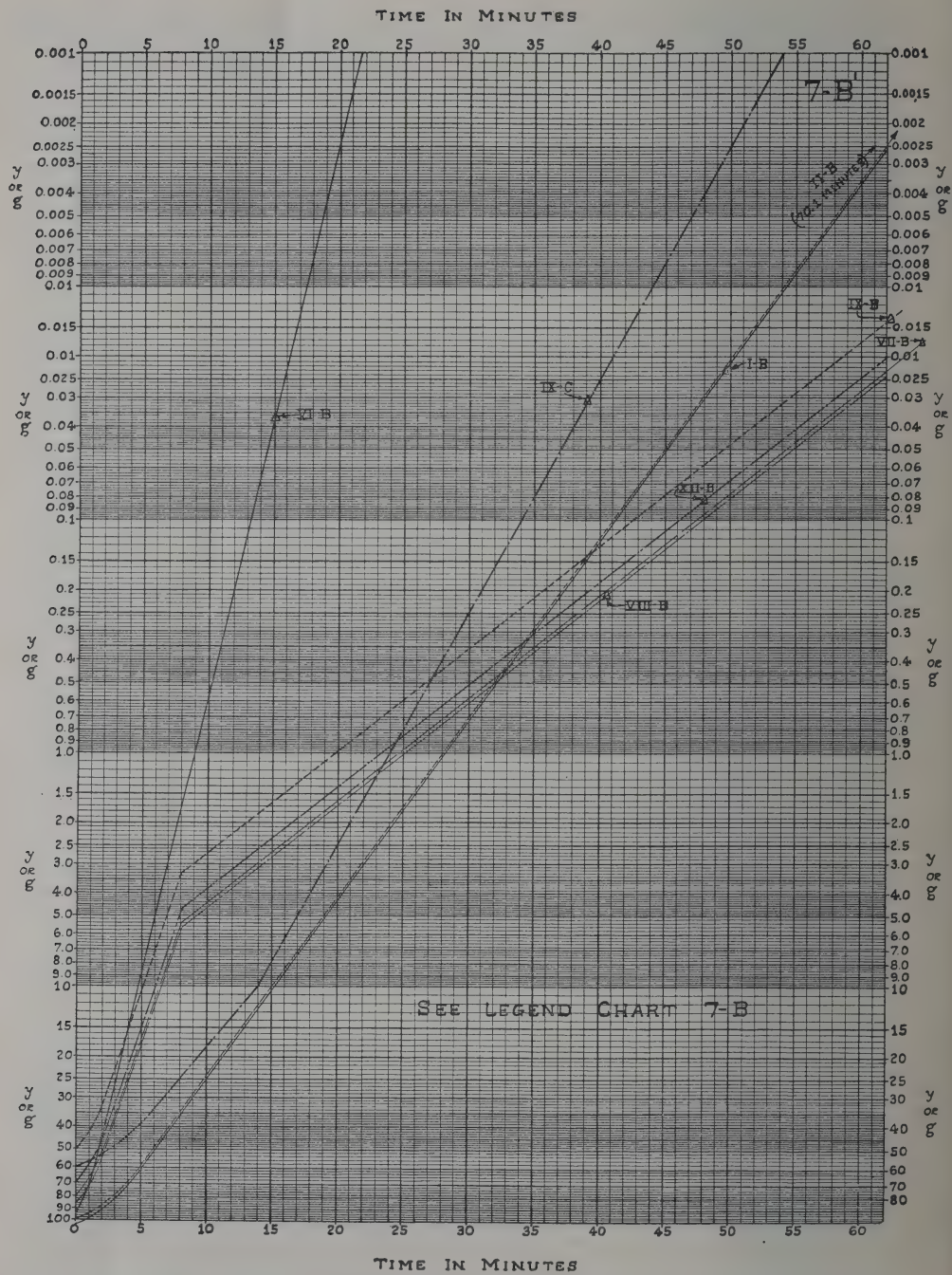


CHART 7B





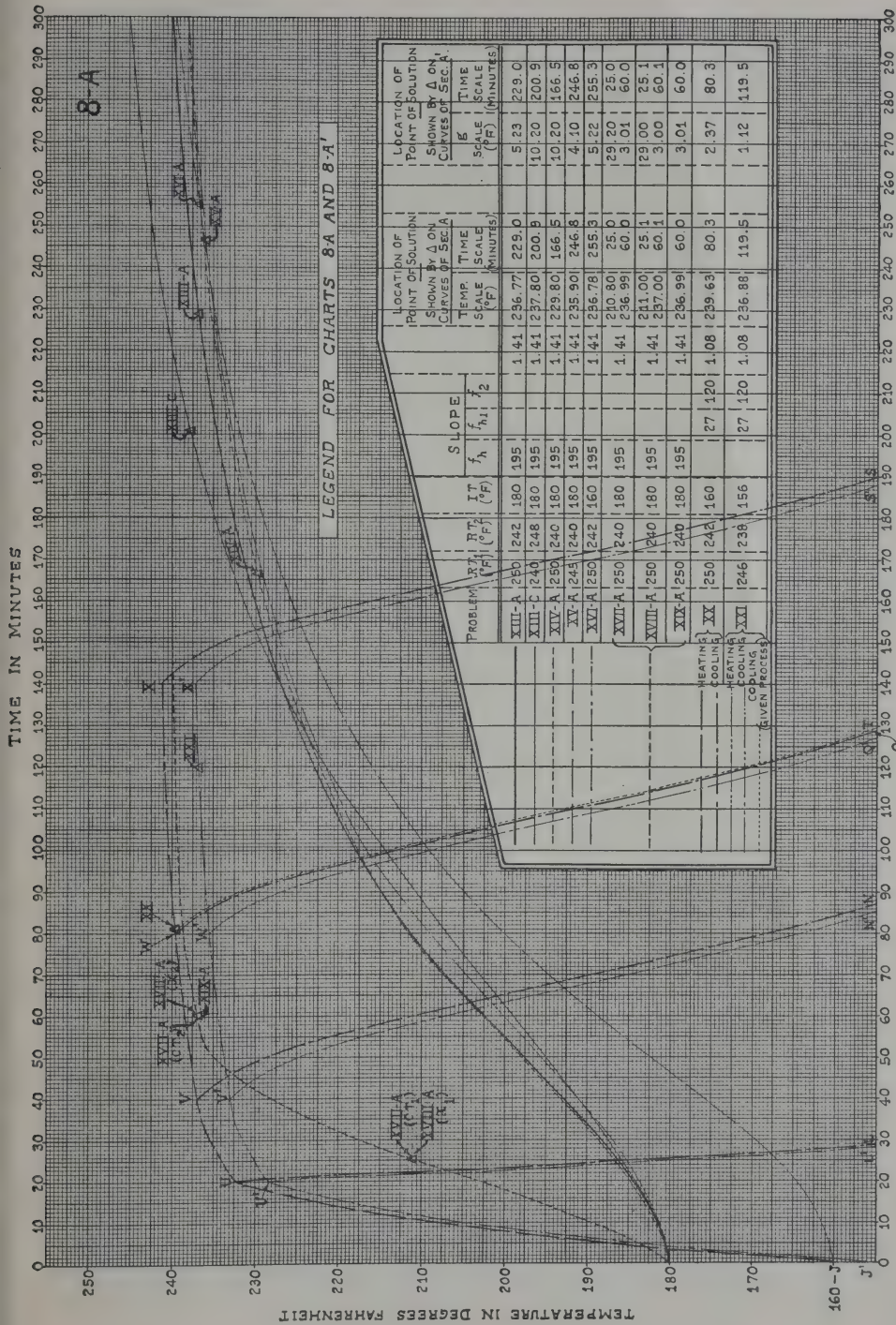
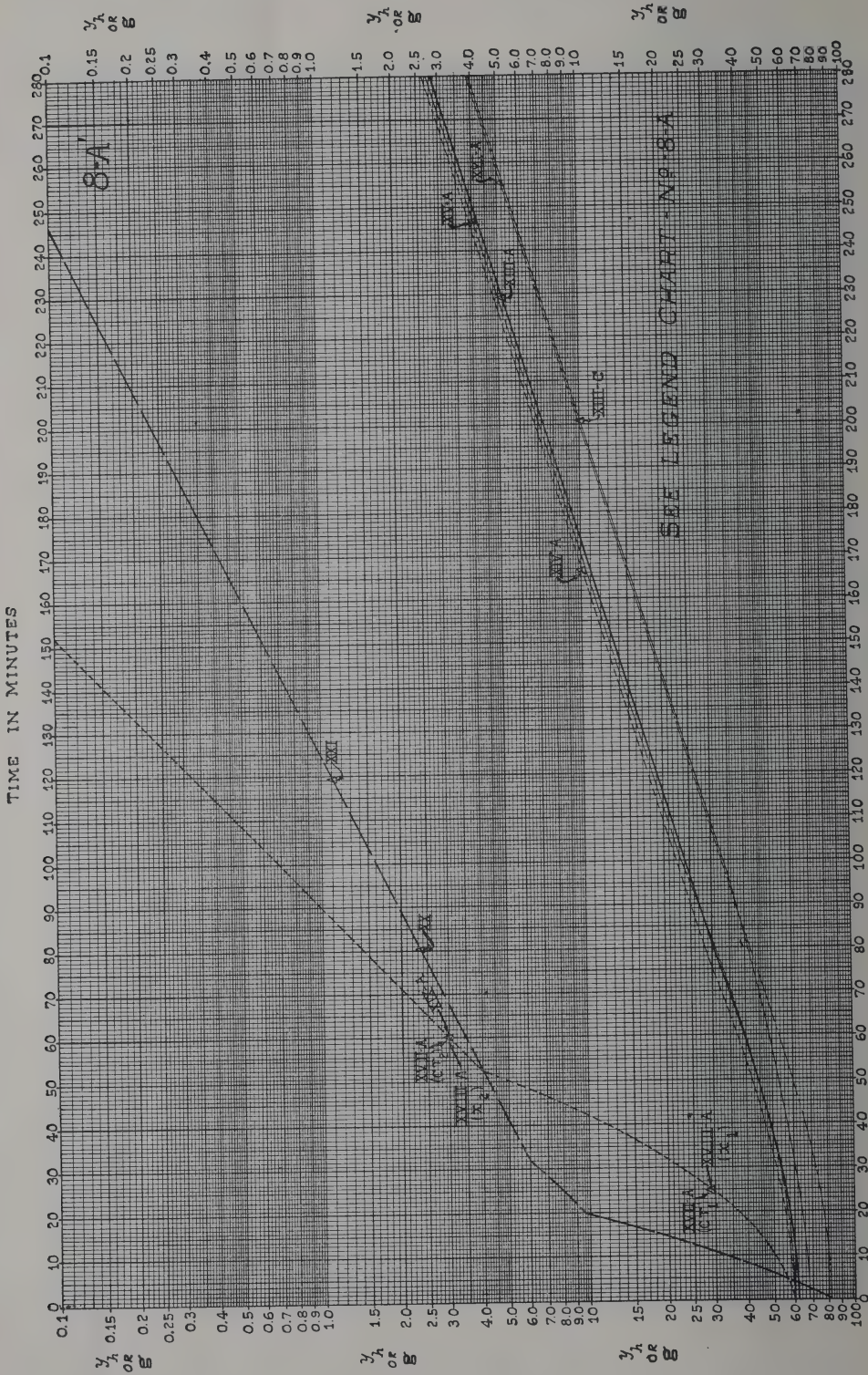


CHART 8A





TIME IN MINUTES

CHART 8A'



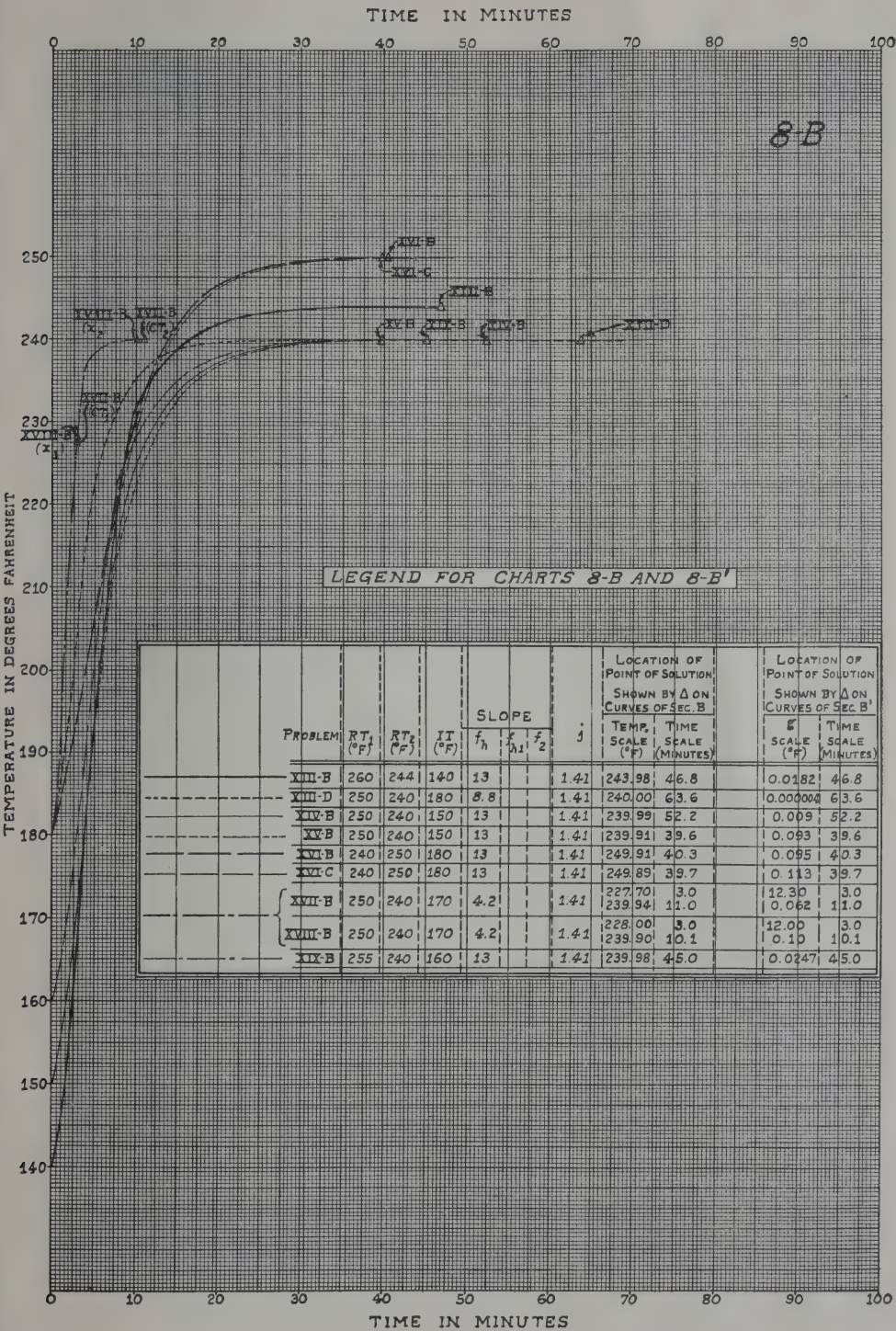
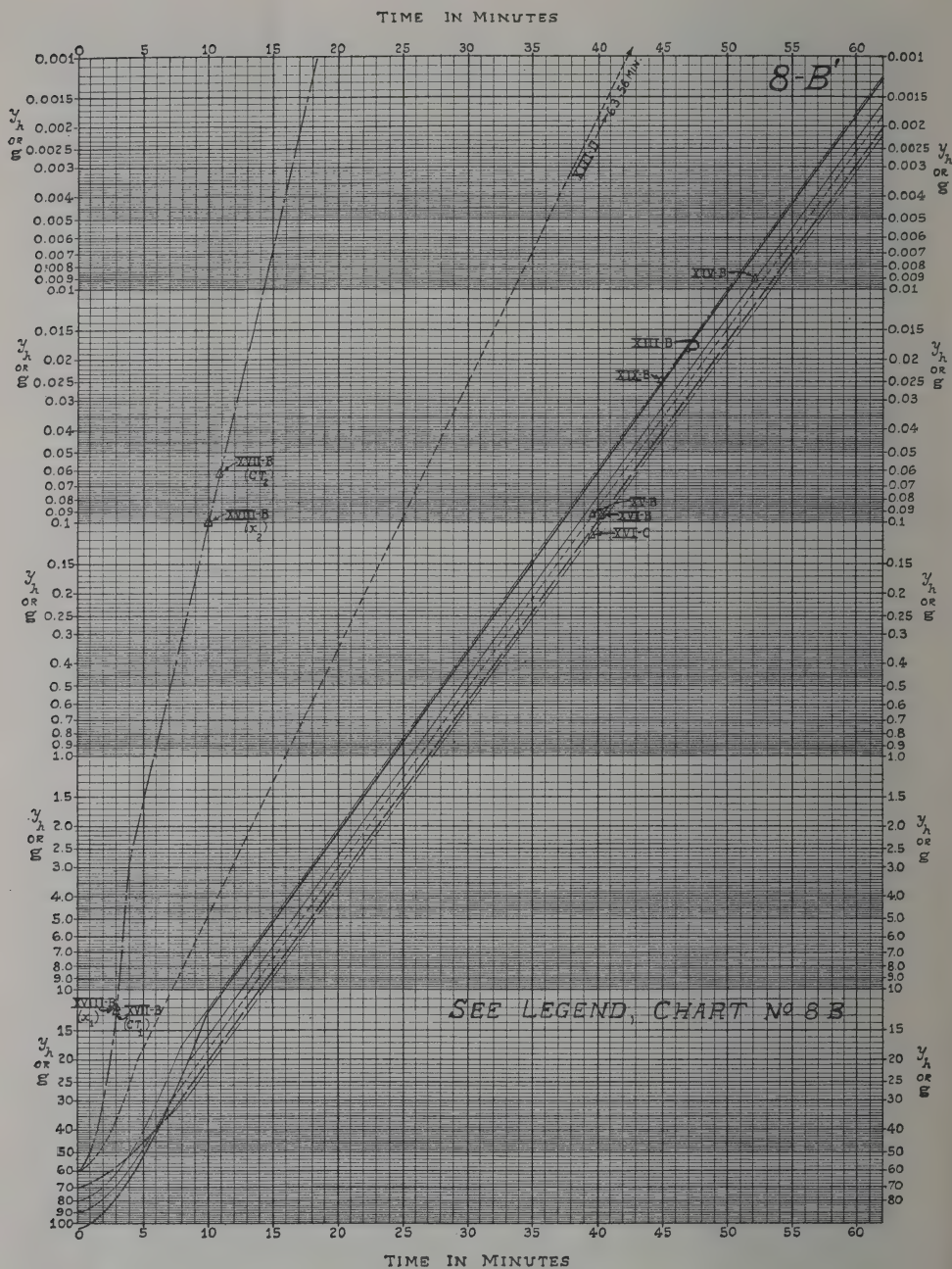


CHART 8B











UNIVERSITY OF ILLINOIS

MAY 1 1930

THE LIBRARY OF THE







UNIVERSITY OF ILLINOIS-URBANA



3 0112 120065765